

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND
MIKROBIOLOOGIA INSTITUUT

Kristel Parv

**Inimese kliinilistest materjalidest ja seedetrakti mikrobiotast isoleeritud
Escherichia coli tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse**

Bakalaureusetöö

Juhendaja vanemteadur Epp Sepp

Kaasjuhendaja mikrobioloogia dotsent Tiina Alamäe

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Perekonna <i>Escherichia</i> üldiseloomustus.....	6
1.2 <i>E. coli</i> poolt põhjustatud infektsioonid	6
1.2.1 Seedetrakti infektsioonid.....	7
1.2.2 Kuseteede infektsioonid	7
1.2.3 Bakterieemia.....	8
1.3 <i>E. coli</i> virulentsusfaktorid	9
1.3.1 Laiendatud spektriga β -laktamaasid	9
1.3.1.1 ESBL-i tootmise määramine	13
1.4 <i>E. coli</i> fülogenees	15
1.4.1 Fülogeneetilist kuuluvust mõjutavad tegurid	16
1.4.2 Fülogeneetiline kuuluvus ja patogeensus.....	17
1.4.3 Fülogeneetiline kuuluvus ja resistentsus antibiootikumidele.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Kasutatud tüved	20
2.2.2 <i>E. coli</i> isoleerimine ja identifitseerimine	21
2.2.3 ESBL-i tootmise määramine	22
2.2.4 DNA eraldamine	23
2.2.5 Fülogeneetilise grupi määramine	23
2.2.6 Statistiline analüüs	25
2.3 Tulemused ja arutelu	25
2.3.1 ESBL-negatiivsete <i>E. coli</i> tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse	25
2.3.2 ESBL-positiivsete <i>E. coli</i> tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse.....	30
2.3.2.1 Uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete <i>E. coli</i> tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse	31
2.3.2.2 Verest isoleeritud ESBL-positiivsete <i>E. coli</i> tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse	32
2.3.3 ESBL-negatiivsete ja ESBL-positiivsete <i>E. coli</i> tüvede võrdlus	33

KOKKUVÕTE.....	35
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUS.....	40
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
LISA 1	46
LISA 2	47
LISA 3	48
LIHTLITSENTS	50

KASUTATUD LÜHENDID

CLSI- Kliiniliste ja Laboratoorsete Standardite Instituut (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CT/CTL- *cefotaxime/cefotaxime* koos klavulaanhappega

DDST- kaksikdisk sünergia test (*double-disk synergy test*)

E. coli- *Escherichia coli*

ESBL- laiendatud-spektriga β -laktamaas (*Extended-Spectrum β -Lactamase*)

EUCAST- Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Euroopa Komitee (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

MALDI-TOF MS- maatriksaine vahendatud laseril põhinev desorptsioon-ionisatsioon lennuaja mass-spektromeetria (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*)

MIK- minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon

PAI- patogeensuse saared (*pathogenicity islands*)

PBP- penitsilliini siduv valk (*penicillin binding protein*)

PM/PML- *cefepime/cefepime* koos klavulaanhappega

TOF- lennuaeg (*time-of-flight*)

TZ/TZL- *cefazidime/ceftazidime* koos klavulaanhappega

SISSEJUHATUS

Escherichia coli (*E. coli*) on Gram-negatiivne liikuv pulkbakter. *E. coli* on inimeste ja teiste imetajate väljaheites kõige sagedasem fakultatiivne anaeroob (Schaechter, 2009). *E. coli* tüved võivad olla kommensaalsed (kuna nad on osa seedetrakti normaalsest mikrobiotast) ja/või põhjustada erinevaid infektsioone (seedetrakti siseseid ja väliseid) (Picard *et al.*, 1999). *E. coli* on kuseteede infektsioonide tekitajaks 90% juhtudest (Madigan *et al.*, 2011) ning bakterieemia põhjustajaks 17–37% juhtudest (Russo ja Johnson, 2003).

Kõige sobivamad antibiootikumid *E. coli* infektsioonide raviks on β -laktaamid ja kinoloonid, mille sagedase kasutamise tõttu on tõusnud bakterite resistentsus nendele. Bakteriaalsete infektsioonide ravi muudavad keeruliseks *E. coli* poolt produtseeritavad laiendatud spektriga β -laktamaasid (ESBL; *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*), mis hüdrolüüsivad enamikke β -laktaam-antibiootikume (Mims *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2011).

E. coli tüve virulentsuse määramisel on oluline tüve fülogeneetiline ehk evolutsiooniline kuuluvus (A, B1, B2, D). Enamus ekstraintestinaalseid patogeenseid tüvesid kuulub fülogeneetilisse gruppi B2 ning kommensaalsed ehk intestinaalsed tüved kuuluvad A ja B1 fülogeneetilistesse gruppidesse (Picard *et al.*, 1999). Viimase 20 aasta jooksul on arenenud riikides märgatavalt suurenenud B2 grupi tüvede osakaal tervete inimeste seedetrakti mikrobiotas (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b). Antibiootikumidele resistentsed *E. coli* tüved kuuluvad tavaliselt fülogruppidesse väljaspool B2 gruppi ning ohustavad madala virulentsuse tõttu eelkõige immuunpuudulikkusega inimesi. ESBL-e tootvad *E. coli* tüved kuuluvad aga enamasti fülogeneetilistesse gruppidesse B2 ja D. Samas erineb fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine vastavalt ESBL-i tüübile (Branger *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009; Nazir *et al.*, 2011).

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda erinevatest kliinilistest materjalidest (uriin, veri) ja inimese seedetrakti mikrobiotast isoleeritud ESBL-negatiivsete *Escherichia coli* tüvede fülogeneetilist kuuluvust; võrrelda Eestis, Lätis, Leedus ja Peterburis kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede fülogeneetilist kuuluvust; võrrelda ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilist kuuluvust ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvedega. Töö koosneb kahest osast, millest esimene on teemakohase kirjanduse ülevaade ja teine eksperimentaalosa. Viimane viidi läbi Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Mikrobioloogia Instituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Perekonna *Escherichia* üldiseloomustus

Perekond *Escherichia* kuulub sugukonda enterobakterid (*Enterobacteriaceae*), seltsi enterobakterilaadsed (*Enterobacteriales*), klassi gammaproteobakterid (*Gammaproteobacteria*), hõimkonda proteobakterid (*Proteobacteria*) (Scheutz ja Strockbine, 2005).

Escherichia perekonnas on palju erinevaid tüvesid, mis erinevad patogeense potentsiaali poolest. Teatud tüved on harilikud mitte-patogeensed imetajate soolestikus, teised põhjustavad seede-, kuseteede-, vere- ja kesknärvisüsteemi infektsioone (Schaechter, 2009).

Perekonda *Escherichia* kuulub 5 liiki: *E. coli* (tüüpliik), *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* ja *E. vulneris* (Scheutz ja Strockbine, 2005).

E. coli on Gram-negatiivne, asporogeenne, kemoheterotroofne, fakultatiivselt anaeroobne liikuv pulgake. Energiat saab ta kääritamisest või hingamisest. Suhkrute kääritamisel anaeroobsetes tingimustes tekivad 2,3-butaandiool, etanool, laktaat, suksinaat, atsetaat, CO₂ ja H₂. Glükoosi sisaldaval söötmel kasvab kiiremini kui teistel süsinikuallikatel. *E. coli* ei fikseeri lämmastikku, kuid suudab kasutada mitmeid teisi ühendeid lämmastikuallikana. Anaeroobsetes tingimustes suudab ta nitraatselt hingata (Schaechter, 2009).

E. coli on inimeste ja teiste imetajate väljaheites kõige sagedasem fakultatiivne anaeroob-10⁷–10⁸ organismi ühe grammi väljaheite kohta. Samas on käärsooles rangeid anaeroobe 100 korda rohkem kui *E. coli* tüvesid ning kõik gammaproteobakterite esindajad kokku moodustavad vähem kui 1% soolestiku mikrobiotast. Fekaalsest mikrobiotast moodustavad enterobakterid 0,4–1%. Vanuse suurenedes enterobakterite osakaal kasvab, mis võib mängida rolli sagedasemal haigestumisel seedetrakti infektsioonidesse (Marchesi ja Shanahan, 2007; Schaechter, 2009; Dore ja Corthier, 2010; Madigan *et al.*, 2011).

Escherichia liikidel võib olla toiteväärtuslik roll inimese ja teiste soojavereliste loomade soolestikus, sünteesides vitamiine (eriti K vitamiini). Fakultatiivse aeroobina tarvitab *E. coli* ära O₂, muutes jämesoole anoksiliseks. *E. coli* tüved suudavad kasvada väga erinevatel süsiniku- ja energiaallikatel (Madigan *et al.*, 2011).

1.2 *E. coli* poolt põhjustatud infektsioonid

Inimese *E. coli* tüved võivad olla kommensaalsed (kuna nad on osa seedetrakti normaalsest mikrobiotast) ja/või põhjustada erinevaid infektsioone. Piir *E. coli* tüvede kommensaalsuse

ja patogeensuse vahel oleneb ühelt poolt peremeesorganismi seisukorrast ning teiselt poolt bakteri virulentsusfaktorite ekspressioonist (Picard *et al.*, 1999). Patogeensed *E. coli* tüved võivad põhjustada lisaks seedetrakti infektsioonidele ka kuseteede infektsioone, sepsist ja meningiiti (Mims *et al.*, 2004).

1.2.1 Seedetrakti infektsioonid

E. coli tüved, mis põhjustavad seedetrakti siseseid infektsioone, jagatakse rühmadesse (enterotoksigeenne, enteropatogeenne, enterohemorraagiline, enteroinvasiivne ja enteroagregatiivne) vastavalt nende poolt põhjustatud kliinilisele pildile ja teadaolevatele virulentsusfaktoritele (Schaechter, 2009).

Enterotoksigeenne *E. coli* toodab kahte erinevat enterotoksiini, mis mõlemad põhjustavad vedeliku ja elektrolüütide sekretsiooni soolestikus. Vesine väljaheide ei sisalda verd ja soolevalendikus ei esine põletikku. Põhjustab nn „turisti“ kõhulahtisust. Enteropatogeenne *E. coli* põhjustab vesist, mõnikord ka verist, kõhulahtisust. Tekitaja ei tooda toksiine ega invasioonifaktoreid. Enterohemorraagiline *E. coli* toodab Shiga-taolist toksiini (Vero toksiin) ning põhjustab hemorraagilist koliiti ehk jämesoole põletikku. Enteroinvasiivsetel *E. coli* tüvedel on invasioonifaktorid ja nad põhjustavad kudede hävimist ja põletikku, mis on sarnane shigelloosile. Enteroagregatiivse *E. coli* tüved on seotud alla 6-kuuliste imikute kõhulahtisusega, mis püsib nädalaid (Schaechter, 2009).

1.2.2 Kuseteede infektsioonid

Urotrakti infektsioonid on tõsine probleem nii inimestel kui ka koduloomadel. Kuseteede infektsioon on inimestel üks sagedasemaid bakteriaalseid infektsioone ning mõjutab hinnanguliselt 130–175 miljonit inimest aastas, põhjustades märkimisväärset töövõime vähenemist ja suurenenud tervishoiukulutusi (Russo ja Johnson, 2003).

Kuseteede infektsioone põhjustavad kõige sagedamini *E. coli* tüved (90% juhtudest). Teised kuseteede infektsioone põhjustavad patogeenid on perekondadest *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ja *Enterococcus* (Madigan *et al.*, 2011).

Bakteriuria on bakterite leidumine uriinis (Mims *et al.*, 2004). Süptomaatilise bakteriuria juhud jaotatakse kaheks: tsüstiit e põiepõletik ja püelonefriit e neeruvaagna põletik (Marrs *et al.*, 2005). Tsüstiidi sümptomiteks on düsuuria (kõrvetav valu urineerimisel), sage urineerimine, uriin on hägune ning võib sisaldada verd. Püelonefriidi sümptomiteks on tsüstiidi sümptomid, millele lisanduvad tavaliselt palavik ja seljavalu (Mims *et al.*, 2004). Kui

tsüstiit paraneb tervetel inimestel ilma tüsistusteta, siis püelonefriit võib viia neerupuudulikkuseni ning lõppeda surmaga. Inimestel, kellel on nõrk immuunsüsteem, kaasasündinud anomaaliad või takistused kuseteedes, on suurem risk, et kuseteede põletik areneb süsteemseks infektsiooniks (Marrs *et al.*, 2005).

Korduvad kuseteede infektsioonid esinevad 20–30% naistest, meestel on kuseteede infektsioonid harvemad ja esinevad enamasti peale 50. eluaastat. Bakteriaalne infektsioon omandatakse tavaliselt ureetra kaudu, kust see liigub kusepõide (ülenev infektsioon). Naiste lühem ureetra on ebaefektiivsem bakterite tõrjumisel kui meeste ureetra, mistõttu esineb naistel kuseteede infektsioone sagedamini. Infektsioon võib kusepõiest edasi liikuda neerudesse. Mõnikord võivad kuseteedes olevad bakterid tungida vereringesse ja põhjustada sepsist (Mims *et al.*, 2004).

Uriinist pärit mikrobioloogiliste leidude tõlgendamine võib olla keeruline, kuna haigust põhjustav organism on sageli osa normaalsest mikrobiotast (näiteks *E. coli*). Kuseteede infektsiooniks loetakse tulemust 10^5 või rohkem organismi ühe milliliitri keskjoa uriini kohta (Madigan *et al.*, 2011). Kui kuseteede infektsiooni sümptomid (valulik ja sage urineerimine või veri uriinis) on olemas, võib kliiniliselt oluliseks lugeda ka 100 uropatogeenset bakterit 1 milliliitri uriini kohta (Marrs *et al.*, 2005).

1.2.3 Bakterieemia

Bakterieemia on bakterite esinemine vereringes. Patogeeni translokatsioonil vereringesse võib tekkida süsteemne infektsioon ehk sepsis ning bakterid võivad levida teistesse kudedesse. Sepsise tulemusel võib tekkida põletik, mis kulmineerub septilise šoki ja surmaga. Bakterieemia ja sepsis saavad peaaegu alati alguse lokaalsest põletikust mõnes organis, näiteks neerudes või soolestikus (Madigan *et al.*, 2011).

E. coli on kõige sagedasem bakterieemia põhjustaja täiskasvanud patsientidel (17–37% juhtudest) (Russo ja Johnson, 2003). Bakterieemia on tavaliselt põhjustatud *E. coli* tüvede poolt, millel on palju erinevaid virulentsusfaktoreid (adhesiinid, raua omastamise süsteemid, toksiinid, peremehe immuunsüsteemi nõrgestavad mehhanismid) (Martinez *et al.*, 2006). Samas on leitud, et hemolüsiini tootvad bakterid põhjustavad harvem septilist šokki ja hulgiorganipuudulikkust ning antud tüvede puhul on patsientide suremus madalam (Hekker *et al.*, 2000).

Patsientidel, kellel on *E. coli* bakterieemia, on suremus 8–31% ning ellujäämistõenäosus suureneb varase efektiivse antibakteriaalse raviga (Rodriguez-Bano *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2010; Camins *et al.*, 2011).

1.3 *E. coli* virulentsusfaktorid

Mikroobi virulentsus on patogeensuse määr ehk tema võime põhjustada peremeesorganismis infektsioone. Virulentsusfaktorid võimaldavad eristada potentsiaalseid patogeene ohutust tüvedest. *E. coli* patogeensus sõltub erinevatest virulentsusfaktoritest (Johnson, 1991).

Virulentsusfaktorid on vajalikud ületamaks peremehe kaitsemehhanisme, tungimaks peremehe kudesse ja kutsumaks esile lokaalset põletikulist vastust. Virulentsusfaktorid kuuluvad mitmetesse funktsionaalsetesse gruppidesse: adhesiinid (P, S ja F1C fimbriad), toksiinid (hemolüsiin, tsütotoksiline nekrotiseeriv faktor) ja raua omastamise süsteemid (enterobaktiin, aerobaktiin). Biofilmi moodustamist võib samuti lugeda patogeensuse mehhanismiks, kuna see võimaldab tüvedel vastu pidada urogenitaal- või seedetraktis ning takistab bakterite hävitamist peremehe immuunsüsteemi poolt (Skjot-Rasmussen *et al.*, 2012).

Virulentsusgeenid paiknevad sageli kromosoomis patogeensuse saartel (PAI; *pathogenicity islands*), millelele on omane kõrge sagedusega deleteeruda ning läbida duplikatsioone ja amplifikatsioone (Hacker *et al.*, 1997). Virulentsusgeenid asuvad ka mobiilsetel geneetilistel elementidel- bakteriofaagidel, plasmiididel ja transposoonidel. Bakteriofaagid kodeerivad *Shiga*-taolist toksiooni. Plasmiididel asuvad geenid kodeerivad näiteks enterotoksiine, adhesiine, hemolüsiini ja ureaasi. Transposoonidel asuvad aerobaktiini siderofooride geenid, hemolüsiini ja piilide operonid (Madigan *et al.*, 2011).

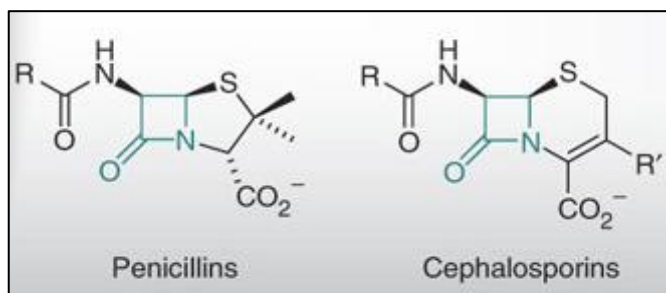
Üheks oluliseks virulentsusfaktoriks on *E. coli* tüvede resistentsus erinevatele antibiootikumidele.

1.3.1 Laiendatud spektriga β -laktamaasid

Kõige sobivamad antibiootikumid *E. coli* infektsioonide raviks on β -laktaamid (penitsilliinid, tsefalosporiinid, karbapeneemid, monobaktaamid) ja kinoloonid. Kõik β -laktaam-antibiootikumid sisaldavad β -laktaamtuuma ja inhibeerivad bakterites peptidoglükaani sünteesi, seondudes penitsilliini siduvatele valkudele (PBP; *penicillin binding protein*). PBP-d on membraanivalgud (transpeptidaasid, transglükosülaasid, karboksüpeptidaasid), mis osalevad bakteri rakuseina sünteesil. Ühe või mitme sellise ensüümi inhibeerimise tulemusel

(seondumisel β -laktaam-antibiootikumiga) akumul eeruvad rakuseina prekursorühikud, mis aktiveerivad raku autolüütilise süsteemi, põhjustades selle lüüsi (Mims *et al.*, 2004).

Tänapäeval kasutatakse infektsioonide raviks erinevaid β -laktaam-antibiootikume. β -laktaam-antibiootikumide perekonda kuuluvad bakteriotsiidseid ühendeid jagatakse gruppidesse β -laktaamtuumaga ühendatud rõnga struktuuri järgi (penitsilliinidel on viie-liikmeline rõngas, tsefalosporiinidel 6-liikmeline rõngas (joonis 1)) ning nende rõngaste küljes olevate kõrvalahelate järgi (Mims *et al.*, 2004).



Joonis 1. Penitsilliinide (vasakul) ja tsefalosporiinide (paremal) põhistruktuur. Roheliselt on näidatud konserveerunud β -laktaamtuum (Macheboeuf *et al.*, 2007).

Mõned β -laktaam-antibiootikumid, näiteks penitsilliin, toimivad peamiselt Gram-positiivsetele organismidele. Teised, näiteks poolsüntetiliselt modifitseeritud penitsilliinid, teise, kolmanda ja neljanda põlvkonna tsefalosporiinid, monobaktaamid ning karbapeneemid toimivad ka Gram-negatiivsetele bakteritele (Mims *et al.*, 2004).

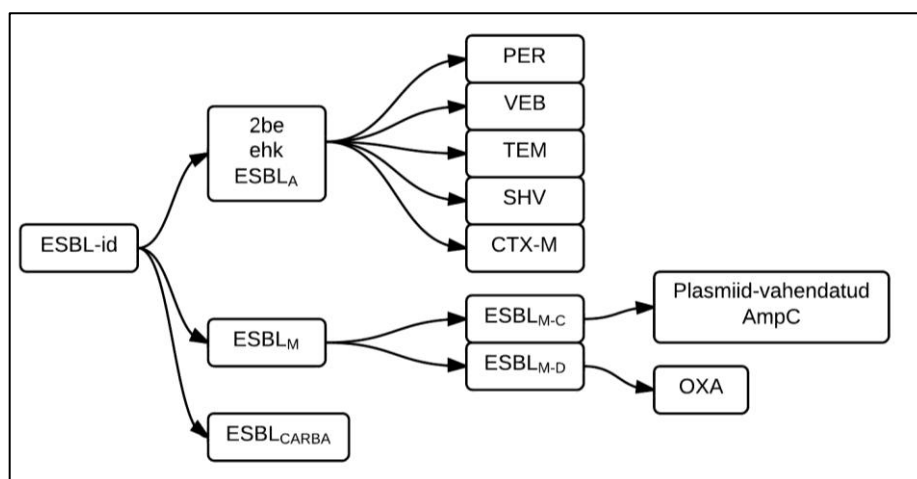
Antibiootikumide sagedase kasutamise tõttu on tõusnud bakterite resistentsus β -laktaam-antibiootikumidele (Meier *et al.*, 2011). Bakterite resistentsuse β -laktaamidele on seotud erinevate mehhanismidega. Üheks mehhanismiks on β -laktamaaside tootmine. β -laktamaasid on ensüümid, mis katalüüsivad β -laktaamtuumade hüdrolüüsi, mille tulemusena tekib mikrobioloogiliselt inaktiivne produkt. Tänapäeval on kirjeldatud sadu erinevaid β -laktamaase, millel on sama funktsioon, aga erinev aminohappeline järjestus, mis mõjutab nende afiinsust erinevatele β -laktaam-antibiootikumidele. Osad ensüümid seonduvad spetsiifiliselt penitsilliinidele või tsefalosporiinidele, teised ründavad enamikke β -laktaam-antibiootikume ning neid nimetatakse laiendatud spektriga β -laktamaasideks (Mims *et al.*, 2004).

ESBL-e tootvad mikroobitüved on võimelised hüdrolüüsima lisaks penitsilliinidele ka tsefalosporiine (*ceftazidime*, *ceftriaxone*, *cefotaxime*) ning monobaktaame (*aztreonam*), aga mitte tsefamütsiine (*cefoxitin*, *cefotetan*) või karbapeneeme. Samas on ESBL-id inhibeeritavad β -laktamaaside inhibiitoritega (klavulaanhape, tazobaktaam, sulbaktaam). Seda

unikaalset omadust kasutatakse fenotüübilise testi läbiviimisel ESBL-ide kindlakstegemiseks (Perez *et al.*, 2007).

β -laktamaaside klassifitseerimiseks kasutatakse kahte süsteemi: Ambleri skeem ja Bush-Medeiros-Jacoby süsteem. ESBL-id kuuluvad Bush-Medeiros-Jacoby süsteem gruppi 2be ja 2d ning Ambleri süsteemi A ja D klassi (Perez *et al.*, 2007). 2be tähistab seda, et need ensüümid on pärit 2b β -laktamaaside grupist (TEM-1, TEM-2, SHV-1) ning „e“ tähistab laiendatud (inglise keeles *extended*) spektrit. TEM-1, TEM-2 ja SHV-1 ensüümidest pärit ESBL-id erinevad oma eellastest 1–4 aminohappe võrra, mille tulemusena on suurel määral muutunud nende ensümaatiline aktiivsus (Rawat ja Nair, 2010). Lisaks SHV- ja TEM-ESBL-idele on hulgaliselt A klassi kuuluvaid mitte-TEM ja mitte-SHV ESBL-e, millest olulisemad on CTX-M-perekond ja PER-perekond. Mõlemaid on kirjeldatud *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter spp* ja *Enterobacter spp* liikidel (Lorian, 2005).

Giske *et al.* (2009) välja pakutud klassifikatsioonis kuuluvad 2be grupi β -laktamaasid klass A ESBL-ide (ESBL_A) hulka. Plasmiid-vahendatud AmpC-tüüpi β -laktamaasid ja OXA-tüüpi β -laktamaasid kuuluvad ESBL_M klassi (inglise keeles *miscellaneous ESBLs*). ESBL_M klassi saab seega jagada veel kaheks kategooriaks: ESBL_{M-D} (OXA-ESBLid; klass D) ja ESBL_{M-C} (plasmiid-vahendatud AmpC-tüüpi β -laktamaasid; klass C). Lisaks esineb ESBL_{CARBA} klass, millesse kuuluvad ESBL-id on võimelised hüdrolüüsima ka vähemalt ühte karbapeneemi (joonis 2) (Giske *et al.*, 2009).



Joonis 2. Giske *et al.* välja pakutud ESBL-ide klassifikatsioon (Giske *et al.*, 2009). Joonise tegemisel on kasutatud veebilehte www.lucidchart.com.

AmpC-tüüpi β -laktamaaside substraadiks on kolmanda põlvkonna tsefalosporiinid, kuid neid ei inhibeeri klavulaanhape. OXA-tüüpi β -laktamaase on kirjeldatud enterobakteritel ning bakteritel *Acinetobacter baumannii* ja *Pseudomonas aeruginosa*. OXA ensüümid annavad

resistentsuse penitsilliinidele ning penitsillinaasresistentsetele penitsilliinidele *cloxacillin*, *oxacillin* ja *methicillin*. Need ensüümid on klavulaanhappega nõrgalt ja naatriumkloriidiga tugevalt inhibeeritud. Teatud juhtudel annavad need resistentsuse ka antibiootikumile *cefepime* ja karbapeneemidele (Lorian, 2005; Rawat ja Nair, 2010).

Kirjanduse andmetel isoleeriti Euroopas kuni hiliste 1990-ndateni peaaegu eranditult TEM ja SHV ensüümide tüüpe peamiselt *Klebsiella* tüvedest. CTX-M ESBL-i leiti harva. Nüüd on olukord oluliselt muutunud- paljudes Euroopa riikides on CTX-M peamine ESBL-i tüüp ja *E. coli* on koos *Klebsiella*'ga peamine peremees. Samuti isoleeritakse järjest enam CTX-M ESBL-i tootjaid keskkonnast omandatud infektsioonide korral. Sarnaselt tekkis ka resistentsus ampitsilliinile peamiselt TEM-1 ensüümi abil, kus alguses levisid resistentsed *E. coli* tüved haigla-keskkonnas ning hiljem leiti resistentsid tüvesid ka keskkonnast omandatud infektsioonide korral. Seega võib CTX-M ESBL-ide puhul ajalugu korduda (Livermore *et al.*, 2007).

Kuna ESBL-e kodeerivad geenid paiknevad enamasti plasmiididel, kanduvad need horisontaalselt ühelt bakteri liigilt teisele ning levivad suure kiirusega. ESBL-i ekspresseerivatel *E. coli* ja *Klebsiella* tüvedel on leitud resistentsust ka teistele antibiootikumide klassidele, kuna mitmed teised resistentsusgeenid kanduvad üle ESBL-i sisaldava plasmidi abil (Vaidya, 2011).

ESBL-i tootvad *E. coli* tüved on kõige sagedasemad patsientidel, kes on varem olnud hospitaliseeritud. Koreas läbi viidud uuringus, kus osales 2312 kuseteede infektsiooniga patsienti, leiti 23% hospitaliseeritud patsientidest ja 12% keskkonnatekkelise infektsiooniga patsientidest ESBL-i tootev *E. coli* tüvi (Lee *et al.*, 2010). Inglismaal läbi viidud uuringus, kus osales 354 bakterieemiaga patsienti, leiti 27% hospitaliseeritud patsientidest ja 7% keskkonnatekkelise infektsiooniga patsientidest ESBL-i tootev *E. coli* (Melzer ja Petersen, 2007). Teatud antibiootikumide tarbimine (näiteks teise põlvkonna tsefalosporiinid) võib samuti soodustada ESBL-i tootvate bakterite selektsiooni (Lee *et al.*, 2010). Antibiootikumide õige kasutamine vähendaks multiresistentsete bakterite esinemissagedust (Siegel *et al.*, 2007).

ESBL-i tootva *Enterobacteriaceae* bakterieemia on seotud väga negatiivsete kliiniliste (kõrgem suremus, pikem haiglasviibimine) ja majanduslike tulemustega- võrreldes ESBL-i mittetootva *Enterobacteriaceae* bakterieemiaga, on ESBL-i tootva *Enterobacteriaceae* bakterieemia patsiendi haiglakulud kaks korda suuremad (Schwaber *et al.*, 2006).

1.3.1.1 ESBL-i tootmise määramine

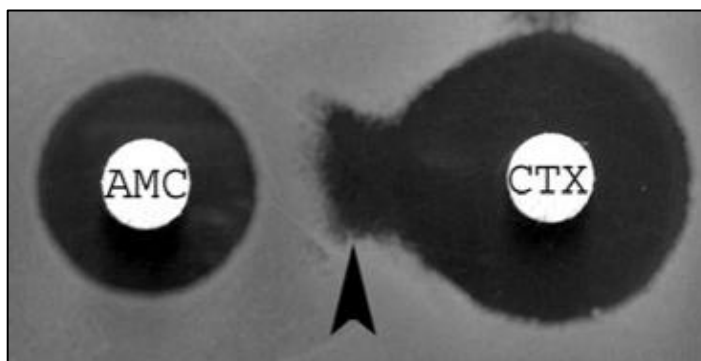
ESBL-i tootvate isolaatide kindlaks määramiseks on kasutusel mitmeid teste, mis on mõeldud *E. coli* ja *Klebsiella* liikidele. Siiski, ESBL-ide ensüümide mitmekesisuse suurenemine ning mitte-ESBL resistentsusmehhanismid (sealhulgas tsefalosporinaaside ületootmine) raskendavad ESBL-i tootjate määramist fenotüübiliste testidega raskendanud (Huang *et al.*, 2010).

Kliiniliste ja Laboratoorsete Standardite Instituut (CLSI; *Clinical and Laboratory Standards Institute*) soovitab ESBL-i tootmise määramisel kasutada kahe-astmelist meetodit, milles esimeseks sammuks on ühe või mitme tsefalosporiini (*cefotaxime*, *ceftriaxone*, *ceftazidime*, *cefpodoxime*) ja *aztreonami* suhtes vähenenud tundlikkuse kindlakstegemine. Vähenenud tundlikkus viitab positiivsele tulemusele. Seejärel viiakse ESBL-i tootmise kinnitamiseks läbi kinnitav test (Drieux *et al.*, 2008).

Kinnitava testina võib kasutada fenotüübilisi ja genotüübilisi meetodeid:

1) Fenotüübilised testid:

- a) Kaksikdisk sünergia test (DDST; *double-disk synergy test*) töötati algselt välja, et eristada tsefalosporinaase ületootvaid tüvesid ESBL-i tootvatest tüvedest. Test viiakse läbi agaril koos 30 µg *cefotaxime* (ja/või *ceftriaxone* ja/või *ceftazidime* ja/või *aztreonam*) diskiga ja amoksitsillin-klavulaanhappe diskiga (10 µg klavulaanhapet), mis paiknevad üksteisest 30 mm kaugusel (keskpunktist keskpunktini). Test loetakse positiivseks, kui koos esineb vähenenud tundlikkus tsefotaksiimi suhtes ja laienenud inhibitsiooni-tsoon kahe diski vahel (sünergia tsefotaksiimi ja klavulaanhappe vahel) (tekib nn lukuauk) (joonis 3).



Joonis 3. Positiivne DDST (Drieux *et al.*, 2008).

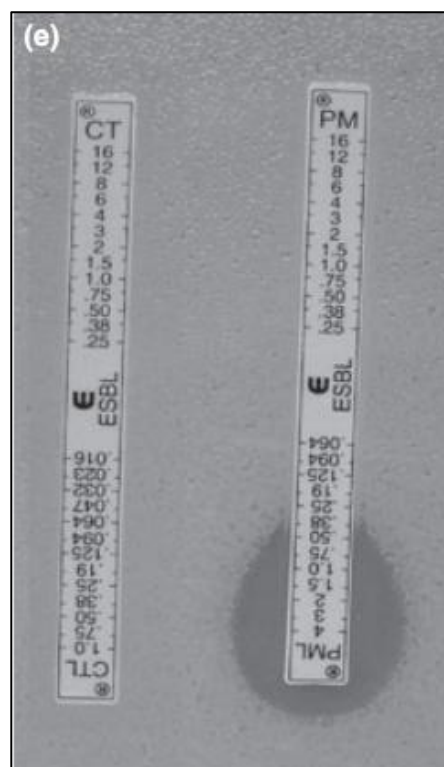
DDST-d loetakse üldiselt usaldusväärseks testiks, kuigi vahel on vajalik diskide vahe muutmine 20 mm-ni, mis oluliselt parandab testi tundlikkust. Giriyaapur *et al.* (2011) leidsid, et enterobakterite hulgas on testi tundlikkus 95% ja spetsiifilisus 76% (Drieux *et al.*, 2008; Giriyaapur *et al.*, 2011).

- b) ESBL E-teste kasutatakse laiendatud spektriga tsefalosporiinide ja klavulaanhappe vahelise sünergia kvantifitseerimiseks. E-testid (CT/CTL (*cefotaxime/cefotaxime* koos klavulaanhappega), TZ/TZL (*cefazidime/ceftazidime* koos klavulaanhappega), PM/PML (*cefepime/cefepime* koos klavulaanhappega)) kujutavad endast ribasid, mille ühes otsas on CT, TZ või PM gradient ning teises otsas antud antibiootikumid koos klavulaanhappega (4 mg/l) (joonis 4). ESBL-i testi loetakse positiivseks, kui:

- a) uuritava ravimi MIK (minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon) väärtus väheneb inokulumi rohkem kui kolme kahekordse lahjendamise järel (MIK väärtus ≥ 8);

- b) esineb ümmargune tsoon CTL, TZL või PML gradiendi madalaima kontsentratsiooni juures;

- c) kitsenevas otsas esineb CT, TZ või PM inhibitsiooni-ellipsi deformatsioon.



Joonis 4. Positiivne ESBL E-test.

- MIK väärtused: CT > 16mg/l, CTL > 1 mg/l, PM > 16 mg/l, PML 0.5 mg/l (Drieux *et al.*, 2008).

ESBL E-testide tulemuste tõlgendamine võib olla keeruline ning on leitud, et laborid võivad 30% juhtudest eksida (Drieux *et al.*, 2008).

- c) Kombinatsiooni diski meetodi korral mõõdetakse inhibitsioonitsooni suurust tsefalosporiini diski ja tsefalosporiini+klavulaanhappe diski ümber. Sõltuvalt diski tüübist on test positiivne kui:

- a) kahe diameetri vaheline erinevus on ≥ 5 mm (vastab kahekordsele lahjendusele);
- b) inhibitsiooni-tsoon suureneb 50%.

Kombinatsiooni diski meetod on lihtne ja kergesti tõlgendatav. Testi tundlikkus on 96% ja spetsiifilisus 100% (Drieux *et al.*, 2008).

- d) Automatiseeritud meetodid, näiteks VITEK 2 ESBL test, mis määrab samaaegselt tsefalosporiinide *cefepime*, *cefotaxime* ja *ceftazidime* antibakteriaalse toime üksi või koos klavulaanhappega. VITEK 2 masin mõõdab vastava antibiootikumi ja klavulaanhappe segu inokulatsiooni järel regulaarsete intervallide järel lahuse hägusust ning võrdleb seda tulemusega, mis saadakse ainult vastava antibiootikumi inokuleerimisel bakteriga. Masin tõlgendab tulemuse kas ESBL-positiivseks või -negatiivseks. VITEK 2 ESBL testi tundlikkuseks ja spetsiifilisuseks on vastavalt 99.5% ja 100% (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* korral), kuid see meetod on ebaefektiivne indutseeritava AmpC tootmisega liikide (näiteks *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ja *Citrobacter freundii*) puhul (süsteem identifitseeris 62.5% ESBL-i tootjatest) (Drieux *et al.*, 2008).

2) Genotüübilised testid:

Need testid põhinevad peamiselt PCR-il ja sekveneerimisel ning viimasel ajal ka mikroplaatide meetodil. Mikroplaatide meetodi tundlikkus ESBL-i määramisel on 97% ja spetsiifilisus 98%. PCR meetodi tundlikkus ja spetsiifilisus on sarnane mikroplaatide meetodi omaga. Kuigi mikroplaatide meetod on täpsem kui fenotüübilised meetodid (E-test, kombinatsiooni diski meetod), on see kallim (Platteel *et al.*, 2011; Wintermans *et al.*, 2012).

1.4 *E. coli* fülogenees

Fülogenees on organismi või selle rühma evolutsiooniline ajalugu. Mikroobide fülogeneesi tuletatakse kaudselt nukleotiidide järjestuste põhjal (Madigan *et al.*, 2011). *E. coli* tüved saab jagada nelja põhilisse fülogeneetilisse gruppi: A, B1, B2 ja D. Lisaks esinevad *E. coli* tüvedel veel grupid C ja E. B2 on vanim grupp, millele järgneb D grupp. Grupp C on gruppide A ja B1 sõsargrupp. Grupp E ilmus peale gruppi D, kuid enne gruppe A, B1 ja C (LISA 1) (Escobar-Paramo *et al.*, 2004a).

Uute virulentsusgeenide püsijäämine ja ekspressioon, mis on vajalik *E. coli* patogeensuse evolutsiooniks, sõltub oluliselt interaktsioonidest bakteri geneetilise tausta ja uute geenide vahel. Näiteks raske akuutse kõhulahtisusega seotud *E. coli* tüved kuuluvad gruppidesse, mis diferentseerusid peale gruppi D. See viitab sellel hetkel *E. coli* genoomis toimunud olulisele muutusele. Peale E grupi teket toimusid edasised modifikatsioonid genoomis, mis viisid

gruppide A, B1 ja C tekkele. Need muutused genoomis võimaldasid uute virulentsusfaktorite omandamist, mis omakorda andsid aluse rasket akuutset kõhulahtisust tekitavatele patovaridele (Escobar-Paramo *et al.*, 2004a).

1.4.1 Fülogeneetilist kuuluvust mõjutavad tegurid

Bakterite liigisisene polümorfism tekib nii mutatsioonide kui ka horisontaalse geeniülekanega. Ökoloogilise struktuuri olemasolu (ehk liigi erinevad tüved on kohanenud kindlatele ökoloogilistele nišsidele) selgitab nii polümorfismi teket kui ka selle püsimist kommensaalsete *E. coli* tüvede hulgas. Kuna patogeensete *E. coli* tüvede eellasteks on arvatavasti kommensaalsed *E. coli* tüved, võib kommensaalsete tüvede geneetilist struktuuri mõjutavate faktorite kindlaks tegemine aidata mõista virulentsete tüvede teket. Kommensaalsete *E. coli* tüvede ökoloogilist struktuuri mõjutavaid faktoreid on mitmeid (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b; Escobar-Paramo *et al.*, 2006):

- 1) **Keskkond.** Näiteks kodustamine mõjutab tugevalt looma seedetrakti mikrobiootat. Farmiloomade *E. coli* tüvesid iseloomustab A ja B1 tüvede suurem ning B2 ja D tüvede väiksem osakaal, võrreldes metsloomadega. Uuringutes on leitud, et B2 tüved on tundlikumad antibiootikumidele kui mitte-B2 tüved. Kuna farmiloomadel on kõrgem antibiootiline surve kui metsloomadel, siis see selgitab, miks A ja B1 tüved on farmiloomadel suurema osakaaluga kui B2 tüved. Samuti esineb liigisisene *E. coli* mitmekesisuse vähenemine kodustatud loomade puhul (Escobar-Paramo *et al.*, 2006).
- 2) **Kliima.** Parasvöötmes esineb tervete inimeste *E. coli* tüvede hulgas fülogeneetilist gruppi A poole vähem kui troopilises vöötmes (14–32% tüvedest parasvöötmes, 50–63,4% tüvedest troopilises vöötmes). Parasvöötme populatsioonides esineb D grupi isolaate rohkem kui troopilises vöötmes (20–28,6% tüvedest parasvöötmes, 0–14,3% tüvedest troopilises vöötmes). Ka B2 grupi isolaatide sagedus varieerub alates 3,2 protsendist troopilises vöötmes kuni 47,7 protsendini parasvöötmes. Samuti on troopilises vöötmes elavate inimeste *E. coli* populatsioon palju mitmekesisem kui parasvöötmes (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).
- 3) **Toitumisharjumused ja hügieenitase.** Kuigi troopiline ja parasvööde erinevad üksteisest suuresti kliima poolest, erinevad Escobar-Paramo *et al.* (2004) läbi viidud uuringus osalenud populatsioonid (Prantsuse Guyana, Cotonou ja Bogotá populatsioonid troopilises vöötmes; Prantsusmaa, Tokyo ja Michigani populatsioonid parasvöötmes) ka sotsiaalmajanduslike faktorite poolest, näiteks dieet ja hügieenitase, mis võivad mõjutada *E. coli* populatsiooni. Samuti erines tervetelt inimestelt

isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine Pariisi populatsioonides 1981. ja 2001. aastal, kui fülogeneetilise grupi B2 sagedus tõusis 10 protsendilt 37 protsendini. Selline gruppidesse jaotumise erinevus ei tulene kliimamuutusest, vaid dieediharjumuste muutusest ja hügieenitaseme tõusust viimase 20 aasta jooksul (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).

1.4.2 Fülogeneetiline kuuluvus ja patogeensus

Enamus ekstraintestinaalseid patogeenseid tüvesid kuulub fülogeneetilise gruppi B2 ning kommensaalset tüved kuuluvad fülogeneetilistesse gruppidesse A ja B1 (Picard *et al.*, 1999). Patogeensed *E. coli* tüved jagunevad fülogeneetiliste gruppide vahel järgmiselt:

- 1) Kuseteede infektsiooni põhjustavatest *E. coli* tüvedest kuuluvad gruppi B2 ligikaudu 2/3 tüvedest, kusjuures fülogruppide jaotus ei sõltu kuseteede infektsiooni tüübist (tsüstiit, püelonefriit, prostatiit) (Zhang *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005).
- 2) Bakterieemiat põhjustavad *E. coli* tüved kuuluvad sagedamini fülogruppidesse D (17–52%) ja B2 (18–67%) harvemini ka fülogruppidesse A (11–21%) ja B1 (3–12%) (Sannes *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2006; Jaureguy *et al.*, 2007; Jaureguy *et al.*, 2008; Bukh *et al.*, 2009).
- 3) Kõhulahtisust põhjustavad patogeensed tüved kuuluvad enamasti gruppidesse A ja B1. Kuna troopilise vöötme populatsioonides esinevad põhilised fülogrupid A ja B1, võib nendel tüvedel olla geneetiline taust, mis on vajalik intestinaalselt patogeensete tüvede tekkeks. See selgitab ka kõhulahtisuse esinemise suuremat sagedust troopilistes riikides (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).

Virulentsusgeenid on enamasti kontsentreerunud eksklusiivselt fülogruppi B2 või fülogruppidesse B2 ja D, kuid esineb ka erandeid (virulentsusgeenid, mis esinevad grupis D, aga mitte grupis B2; virulentsusgeenid, mis on hajutatud ning ei olnud kontsentreeritud B2 ega D gruppi). Üldjuhul aga kannavad tüved fülogeneetilistes gruppides B2 ja D virulentsusfaktoreid, mis puuduvad A ja B1 grupi tüvedel. Näiteks P fimbriad (*pff*), S fimbriaalne adhesiin (*sfa*), F1C fimbriad (*foc*), Dr perekonna adhesiinid (*drb*), aerobaktiin (*aer*), grupp II kapsel (*kpsMT*), välismembraan T (*ompT*), tsütotoksiline nekrotiseeriv faktor 1 (*cnfI*), aju invasiooni valk (*ibeA*) ja hemolüsiin (*hly*) esinevad sageli gruppi B2 ja D kuuluvatel tüvedel. Märgatavad erinevused virulentsusgeenides on ka seedetrakti ja kuseteid koloniseerivate B2 tüvede vahel. Geenid *hly* (hemolüsiin), *cnfI* (tsütotoksiline nekrotiseeriv faktor 1) ja *drb* (Dr perekonna adhesiinid) on rohkem omased kuseteedest pärit B2 grupi tüvedele kui seedetraktist pärit tüvedele. Samuti on kuseteedest pärit B2 ja D grupi tüved

geneetiliselt homogeensemad kui seedetraktist pärit samade gruppide tüved (Johnson *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Viimase 20 aasta jooksul on arenenud riikides märgatavalt suurenenud B2 grupi tüvede osakaal tervetel inimestel (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b). Selgitamaks B2 grupi samaaegset seost patogeensete ja kommensaalsete *E. coli* tüvedega, viidi Le Gall *et al.* (2007) poolt läbi põhjalik geneetiliselt ja ökoloogiliselt mitmekesiste B2 grupi tüvede uuring, milles selgus, et B2 grupis esinevad fülogeneetilised alagrupid (I-IX). Basaalne alagrupp I oli kõrgelt virulentne, mis viitab B2 grupi evolutsiooniliselt konserveerunud virulentsusele. Samas leiti, et alagrupp VIII oli täielikult avirulentne ning igal B2 alagrupil oli kindel geenide komplekt. Uuringu põhjal võib öelda, et virulentsus oli algselt omane B2 grupile ning avirulentsed tüved võisid tuleneda virulentsetest B2 alagruppidest läbi teatud virulentsusgeenide kadumise. Samas on võimalik, et virulentsus võib teatud aja järel kaduda ja seejärel uuesti tekkida läbi horisontaalsete geeniülekanne protsesside (Le Gall *et al.*, 2007).

Kui välja arvata avirulentne alagrupp VIII, viitab teiste alagruppide poolne uuritud virulentsusgeenide (adhesiinide geenid, raua omastamise süsteemi geenid, transkriptsiooni regulaatorite geenid) alalhoidmine selektiivsele survele neid säilitada. Kuigi adhesiine ja raua omastamise süsteemi kodeerivaid geene loetakse virulentsusgeenideks, on need seotud ka kommensaalsete tüvede vastupidamisega seedetraktis. Ka transkriptsiooni regulaatorite geenid on seotud kommensalismiga, kuna bakteri kasvu kiiruse suurenemine on kriitiline seedetrakti kolonisatsiooniks. Need andmed viitavad B2 grupi virulentsuse tekke juhuslikkusele, kuna virulentsusgeenid on vajalikud ka kommensaalsete tüvede seedetrakti kolonisatsiooniks (Le Gall *et al.*, 2007).

1.4.3 Fülogeneetiline kuuluvus ja resistentsus antibiootikumidele

Antibiootikumidele resistentsed *E. coli* tüved kuuluvad ühte kahest kategooriast. Esiteks võivad resistentsed tüved olla ekstraintestinaalsete patogeensete *E. coli* tüvede virulentsed kloonid. Teiseks võivad resistentsed *E. coli* tüved olla madala virulentsusega oportunistid, kes põhjustavad infektsioone eelkõige immuunpuudulikkusega inimestel ning resistentsus antibiootikumidele annab neile selektiivse eelise (Branger *et al.*, 2005).

Juba 1991. aastal märgiti, et fülogeneetilistesse gruppidesse B1, A ja D kuuluvatel *E. coli* tüvedel on sagedamini resistentsus teatud antibiootikumidele (sealhulgas ampitsilliin, tetratsükliin, kloramfenikool, streptomütsiin ja sulfonamiid), nad ekspresseerivad vähem virulentsusfaktoreid ja on ohuks pigem immuunpuudulikkusega inimestele (Johnson *et al.*,

1991). Fluorokinoloonidele resistentsed *E. coli* tüved kuuluvad enamasti madala virulentsusega fülogeneetilistesse gruppidesse A ja B1. Seega on eelnevalt mainitud antibiootikumidele resistentsed *E. coli* tüved madala virulentsusega oportunistid (osade virulentsusfaktorite esinemissageduse vähenemine, vähenenud invasiivsus) ning kujutavad ohtu eelkõige immuunpuudulikkusega inimestele (Velasco *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Vila *et al.*, 2002).

Varasemate uuringute andmetel kuuluvad ESBL-positiivsed *E. coli* tüved enamasti B2 fülogruppi. Nazir *et al.* (2011) poolt Pakistanis läbi viidud uuringus leiti positiivne korrelatsioon B2 fülogrupi ja ESBL-i tootmise vahel (87% B2 fülogrupi tüvedest olid ESBL-positiivsed), samas kui teistes fülogeneetilistes gruppides oli ESBL-positiivsete isolaatide sagedus palju väiksem (40% tüvedest fülogruppides A, B1 ja D olid ESBL-positiivsed) (Nazir *et al.*, 2011). Lõuna-Koreas läbi viidud uuringus kuulusid enamus ESBL-tootvaid *E. coli* isolaate fülogruppi B2 (52%), vähesemal määral ka fülogruppi D (26%) (Song *et al.*, 2009). Prantsusmaal läbi viidud uuringus kuulusid kõikidest ESBL-positiivsetest *E. coli* tüvedest fülogruppi B2, A, D ja B1 vastavalt 36%, 28%, 26% ja 10%. Samuti leiti, et *E. coli* tüved, mis on ESBL_{SHV}- ja ESBL_{TEM}-positiivsed, kuuluvad enamasti B2 fülogruppi, omavad paljusid virulentsusfaktoreid ning on tundlikud fluorokinoloonidele. ESBL_{CTX-M}-positiivsed tüved kuuluvad enamasti D fülogruppi, omavad vähe virulentsusfaktoreid ja rohkem kui pooled on resistentsed fluorokinoloonidele. Seega võib *E. coli* tüve toodetav ESBL-i tüüp ennustada tüve virulentset potentsiaali ning resistentsust fluorokinoloonidele (Branger *et al.*, 2005).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli selgitada välja erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D, A ja B1 ning võrrelda:

- 1) ESBL-negatiivsete (ESBL-e mittetootvate) kommensaalsete ja ekstraintestinaalseid infektsioone põhjustanud *E. coli* tüvede fülogeneetilist kuuluvust;
- 2) ESBL-positiivsete (ESBL-e tootvate) Eesti, Läti, Leedu ja Venemaa (Peterburi) haiglates kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumist;
- 3) ESBL-e tootvate ja mittetootvate *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumist.

Varasemate uuringute andmetel kuuluvad bakterieemiaga ja kuseteede infektsiooniga patsientidelt isoleeritud *E. coli* tüved enamasti fülogruppidesse B2 ja D, kommensaalset *E. coli* tüved fülogruppidesse B1 ja A ning ESBL-positiivsed *E. coli* tüved B2 fülogruppi (Picard *et al.*, 1999; Branger *et al.*, 2005; Nazir *et al.*, 2011). Antud töö tulemused näitavad, kuidas jaotuvad vastavad *E. coli* tüved fülogruppidesse Eestis. Samuti näitavad tulemused ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumist teistes Läänemere regiooni riikides (Läti, Leedu, Venemaa (Peterburi)) ning ESBL-negatiivsete ja -positiivsete tüvede fülogruppidesse jaotumise vahelisi erinevusi.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud tüved

Uurimuse läbiviimiseks kasutati 631 *E. coli* tüve :

- 1) 130 terve inimese seedetrakti mikrobiotast isoleeritud ESBL-negatiivset *E. coli* tüve, isoleeritud Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis ajavahemikus mai–detsember 2012 projekti ABRESIST (Antibiootikumiresistentsuse levikuteed) raames;
- 2) 208 kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-negatiivset *E. coli* tüve, isoleeritud Tartu Ülikooli Kliinikumis Ühendabori bakterioloogia osakonnas:
 - a) 96 kuseteede infektsiooniga patsiendi uriinist isoleeritud *E. coli* tüve, isoleeritud ajavahemikus september–november 2011;
 - b) 112 bakterieemiaga patsiendi verest isoleeritud *E. coli* tüve, isoleeritud ajavahemikus veebruar 2006–detsember 2007.

- 3) 293 kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivset *E. coli* tüve, isoleeritud Läänemere regiooni haiglates ajavahemikus jaanuar–mai 2012 projekti ARMMD (AntibiootikumResistentsuse Molekulaarne Multipleks Diagnostika) raames (tabel 1).

Tabel 1. Erinevates riikides ja erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsed tüved.

Kliiniline materjal	Eesti N=117	Läti N=60	Leedu N=26	Peterburi N=90
Uriin	110	52	19	85
Veri	7	8	7	5

2.2.2 *E. coli* isoleerimine ja identifitseerimine

Tervete inimeste normaalsest mikrobiotast pärit *E. coli* tüvede esmaseks väljasõelumiseks kasutati kromogeenset agarit *Brilliance UTI Agar* (LISA 2), mis on mitte-selektiivne agarsööde ning võimaldab eristada peamisi kuseteede infektsioone põhjustavaid baktereid. Agar sisaldab kahte kromogeeni, millest ühte metaboliseerib *E. coli* ensüüm β -galaktosidaas. *E. coli* moodustab roosasid kolooniaid. *E. coli*'na identifitseeritud kolooniad külvati veriagarile, inkubeeriti 24 h 37°C juures ning säilitati edasiste uuringuteni -80°C juures säilitussöötmega viaalides.

Kliinilistest materjalidest pärit *E. coli* tüved identifitseeriti haigla laborites standardiseeritud meetodite järgi. *E. coli*'na identifitseeritud tüved saadeti edasisteks uuringuteks Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Mikrobioloogia Instituuti ja säilitati -80°C juures säilitussöötmega viaalides.

Eelnevalt kromogeense agariga *E. coli*'na identifitseeritud normaalse mikrobiota tüved ja kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüved külvati sügavkülmas säilitatud säilitussöötmega viaalidest välja mitte-selektiivsele veriagarile ning inkubeeriti 24 h 37°C juures. Seejärel viidi läbi tüve identifitseerimine Brukeri MALDI-TOF MS-ga (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). MALDI on pehme ionisatsiooni tehnika, millega saab töödelda terveid mikroorganisme ilma eelneva töötluseta, kuna enamus vegetatiivseid baktereid lüüsitakse kokkupuutel vee, orgaanilise lahusti ja/või tugeva happega MALDI maatriksis (Croxatto *et al.*, 2012).

MALDI TOF MS tööpõhimõte:

- 1) Veriagaril kasvatatud bakteri koloonia pandi konduktiivsele metall-plaadile ning segati maatriksi α -tsüano-4-hüdroksükaneelhappega. Lahjendamiseks kasutati tootja soovitatud lahustit. Maatriks käitub valgu ja laseri vahel puhvrina. Toimub kristallisatsioon.
- 2) Metall-plaat asetati mass-spektromeetrisse ja pommitati lühikeste laser-pulssidega. Maatriks absorbeerib laseri energia, kannab osa laengust analüüdi molekulidele ning toimub analüüsitava materjali desorptsioon, aurustumine ja ionisatsioon.
- 3) Maatriksilt lahti tulnud ja ioniseeritud molekulid liiguvad seejärel mass-spektromeetrisse, kus detektor need registreerib. Lennuaeg (TOF; *time-of-flight*) ehk aeg, mis kulub detektorini jõudmiseks, sõltub bioanalüüdi massist (m) ja laengust (z). Seega erineva m/z väärtusega bioanalüüdid, mis moodustasid algse kompleksse proovi, lahutatakse vastavalt nende lennuajale ja moodub mass-spekter, mida iseloomustab nii m/z väärtus kui ka vastava m/z väärtusega ionide hulk. MALDI tulemusel tekivad tavaliselt ühelaengulised ioonid ($z=1$) ning seega bioanalüüdi m/z vastab tema massile.
- 4) Saadud spekter on igale mikroobile omane. Mikroobi identifitseerimiseks võrreldakse saadud spektrit andmebaasiga (Croxatto *et al.*, 2012).

MALDI-TOF MS-i efektiivsus ja täpsus sõltub suurel määral taksonoomiast- näiteks kui streptokokkide määramise täpsus oli Cherkaoui *et al.* (2010) uuringus 57%, siis *E. coli* tüvedest määrati õigesti 100% (Cherkaoui *et al.*, 2010). MALDI-TOF MS-i abil on võimalik kiirelt (< 4 h) määrata ka bakterite resistentsust β -laktaam-antibiootikumidele (Sparbier *et al.*, 2012).

2.2.3 ESBL-i tootmise määramine

Kliinilisest materjalist isoleeritud *E. coli* tüvede ESBL-i tootmine määrati haiglate mikrobioloogia laborites vastavalt ühtsele protokollile. Esmalt määrati kindlaks ühe või mitme β -laktaam-antibiootikumi suhtes vähenenud tundlikkus, kasutades Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Euroopa Komitee (EUCAST; *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) 2.0 kriteeriume. Vähenenud tundlikkus viitas võimalikule β -laktamaasi tootmisele. ESBL-i tootmise kinnitamiseks kasutati ESBL ROSCO komplekti (ESBL + AmpC Confirm kit) (kombinatsiooni diskide meetod) (LISA 3).

2.2.4 DNA eraldamine

E. coli tüved külvati sügavkülmast mitte-selektiivsele veriagarile ning inkubeeriti 24h 37°C juures. DNA eraldamiseks puhaskultuurist kasutati komplekte QIAamp DNA Minikit 250 (Qiagen) ning PureLink Pro96 Genomic DNA Kit (Invitrogen). DNA eraldamine toimus tootjate protokollide järgi. DNA säilitati edasisteks uuringuteks -20°C juures.

2.2.5 Fülogeneetilise grupi määramine

E. coli fülogeneetiline grupp määrati PCR meetodiga geenide *chuA* ja *yjaA* ning DNA fragmendi TSPE4.C2 kindlakstegemisega. Selle meetodi täpsus on Clermont *et al.* (2000) andmetel suurem kui 99% (Clermont *et al.*, 2000). Gordon *et al.* (2008) andmetel aga määratakse *E. coli* fülogrupp õigesti 80–85% juhtudest ning fülogeneetilise kuuluvuse määramise täpsus sõltub nende Clermonti genotüübist (*chuA*, *yjaA* ja TSP4.C2 olemasolust/puudumisest) (Gordon *et al.*, 2008).

chuA geen on vajalik heemi transportimiseks enterohemorraagilisel O157:H7 *E. coli*’l, geeni *yjaA* funktsioon on teadmata. Geeni *chuA* omandasid sõsargrupid B2 ja D varsti pärast nende teket. Fülogeneetilise grupi määramiseks kasutati vastavate geenide ja DNA fragmendi praimereid (tabel 2) (Clermont *et al.*, 2000).

Tabel 2. Fülogeneetilise grupi määramiseks kasutatud praimerid (Clermont *et al.*, 2000).

Geen/ fragment	Praimeri nimetus	Praimeri järjestus	Produkti pikkus (ap)
<i>chuA</i>	chuaA.1	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'	279
	chuA.2	5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
<i>yjaA</i>	yjaA.1	5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3'	211
	yjaA.2	5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	
TspE4.C2	TspE4.C2.1	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3'	152
	TspE4.C2.2	5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	

Kasutatud PCR programm geenide *chuA* ja *yjaA* ning fragmendi TspE4.C2 amplifitseerimiseks:

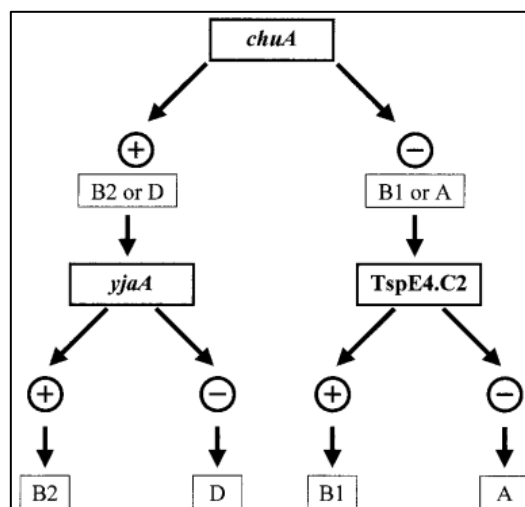
- 5 min 94°C

- 30 tsükliit:
 - 30 sek 94°C
 - 30 sek 55°C
 - 30 sek 72°C
- 7 min 72°C

Geenide *chuA*, *yjaA* ja TspE4.C2 olemasolu kontrolliti geelelektroforeesiga (joonis 5). Selleks lisati 10 µl-le PCR produktile 2 µl 6x Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Segu kanti seejärel 1,5%-lisele etiidiumbromiidi sisaldavale agarosgeelile 1x TAE puhvrts. Elektroforees viidi läbi 150V juures 25 minuti jooksul. DNA fragmentide pikkuse määramiseks kasutati võrdlusena suurusmarkerit (Thermo Scientific) Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl, 50 µg). Geelelektroforeesi läbiviimiseks kasutati firma Bio-Rad Laboratories, Hercules CA aparatsi ja geenide UV-valguses pildistamiseks geelil kasutati GeneSnap tarkvara. Peale PCRi produktide geelelektroforeesi produktide visualiseerimist määrati fülogeneetiline grupp Clermont *et al.* (2000) kirjeldatud skeemi järgi (joonis 6) (Clermont *et al.*, 2000).



Joonis 5. Näide geelipildist. M tähistab Gene Ruler 100 bp DNA suurusmarkerit.



Joonis 6. Fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine vastavalt geenide *chuA* ja *yjaA* ning DNA fragmendi TSPE4.C2 olemasolule (Clermont *et al.*, 2000).

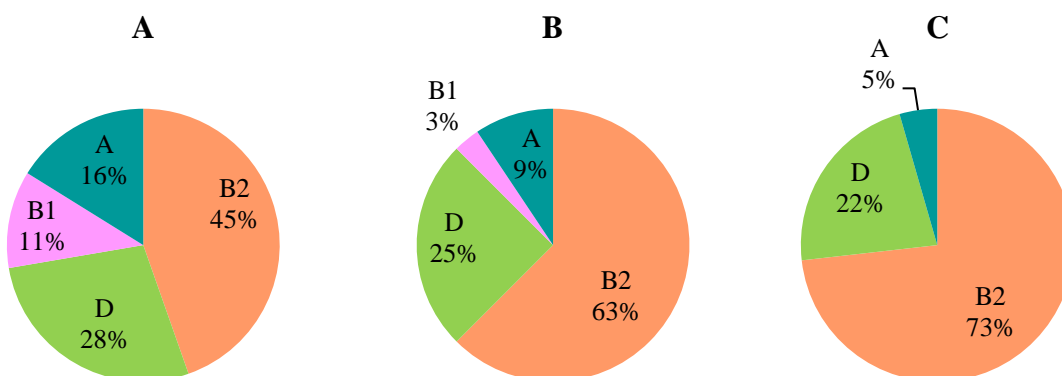
2.2.6 Statistiline analüüs

Statistilise analüüsi läbiviimiseks kasutati veebilehte www.vassarstats.net/tab2x2.html. Gruppidevaheliste erinevuste arvutamiseks kasutati χ^2 -testi ja väikeste eeldatavate sageduste (<5) korral Fisheri täpset testi (*Fisher Exact test*). Kasutati olulisuse nivood $\alpha=0.05$.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse

130 terve inimese roojast isoleeritud ESBL-i mittetootvast *E. coli* tüvest 58 (45%), 36 (28%), 21 (16%) ja 15 (12%) tüve kuulusid vastavalt fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D, A ja B1 (joonis 7). 96 kuseteede infektsiooniga diagnoositud inimese uriinist isoleeritud ESBL-i mittetootvast *E. coli* tüvest 60 (63%), 24 (25%), 9 (9%) ja 3 (3%) tüve kuulusid vastavalt fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D, A ja B1 (joonis 7). 112 bakterieemiaga inimese verest isoleeritud ESBL-i mittetootvast *E. coli* tüvest 82 (73%), 25 (22%) ja 5 (5%) tüve kuulusid vastavalt fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D ja A (joonis 7).



Joonis 7. Tervete inimeste roojast (A), haigete inimeste uriinist (B) ja verest (C) isoleeritud *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse.

Uriinist ja verest isoleeritud *E. coli* tüved kuulusid sagedamini B2 fülogeneetilisse gruppi kui kommensaalsed tüved (vastavalt $p<0.01$ ja $p<0.001$) (tabel 3). Fülogruppe B1 ja A oli enam soole kommensaalsete *E. coli* tüvede hulgas võrreldes verest isoleeritud tüvedega (vastavalt $p<0.001$ ja $p<0.01$) ning fülogruppi B1 enam kommensaalsete *E. coli* tüvede hulgas võrreldes uriinist isoleeritud tüvedega ($p<0.05$) (tabel 3).

Tabel 3. Kommensaalsete ja kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. p-väärtused ^{a,c} <0.01, ^{b,e} <0.001 ja ^d <0.05 väljendavad statistiliselt olulisi erinevusi erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvede fülogeneetiliste kuuluvuste vahel.

Tüve päritolu (n)		Fülogeneetiline grupp % (n)			
		B2	D	A	B1
Kommensaalset tüved (130)		45 ^{a,b} (58)	28 (36)	16 ^c (21)	12 ^{d,e} (15)
Kliinilised tüved	Uriinist (96)	63 ^a (60)	25 (24)	9 (9)	3 ^d (3)
	Verest (112)	73 ^b (82)	22 (25)	5 ^c (5)	0 ^e (0)

Varasemate uuringute andmetel kuuluvad kommensaalsed *E. coli* tüved enamasti fülogruppidesse A ja B1 (tabel 4) ning ekstraintestinaalselt patogeensed tüved enamasti fülogruppidesse B2 ja D (Picard *et al.*, 1999) (tabelid 5 ja 6). Fülogeneetiline kuuluvus on mõjutatud mitmete tegurite poolt, sealhulgas dieet ning hügieentase, mille muutumisega seostatakse viimase 20 aasta jooksul B2 grupi tüvede osakaalu tõusu kommensaalsete *E. coli* tüvede hulgas (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b). Kommensaalsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine on erinevates maailma piirkondades erinev. Kirjanduse andmetel on erinevuste põhjuseks kliima, hügieenitase ja toitumisharjumused (Zhang *et al.*, 2002; Escobar-Paramo *et al.*, 2004b). Tervete inimeste *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse on näidatud tabelis 4.

Eestis tervetelt inimestelt isoleeritud *E. coli* tüvede A fülogruppi kuulumine erines kirjanduses toodud määral troopilise vöötme populatsioonides (Bogotá, Kolumbia, $p < 0.0001$; Cotonou, Benin, $p < 0.0001$) isoleeritud tüvede A fülogruppi kuulumisest (tabel 4) (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).

Eestis isoleeritud kommensaalsete *E. coli* tüvede fülogruppidesse B2, D ja B1 kuulumine ei erinenud statistiliselt olulisel määral Bogotá (Kolumbia) isoleeritud tüvede vastavatesse fülogruppidesse kuulumisest (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).

Tabel 4. Tervete inimeste roojast isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. Aasta keskmised temperatuurid on pärit veebilehelt www.climateemps.com. Siniselt on märgitud riigid, milles isoleeritud kommensaalsete *E. coli* tüvede fülogeneetiline kuuluvus ei erinenud statistiliselt olulisel määral Eestis isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilisest kuuluvusest.

Asukoht	Kliimavööde	Aasta keskmine temperatuur (°C)	% isolaatidest				Viide
			B2	D	A	B1	
Eesti	Parasvööde	4.7	45	28	16	12	Käesolev töö
Michigan, USA	Parasvööde	6.9	48	19	21	13	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Brest, Prantsusmaa	Parasvööde	10.8	33	29	14	24	(Escobar-Paramo <i>et al.</i> , 2004b)
Pariis, Prantsusmaa	Parasvööde	11.6	37	22	30	11	(Escobar-Paramo <i>et al.</i> , 2004b)
Canberra, Austraalia	Parasvööde	12.9	45	23	20	12	(Gordon <i>et al.</i> , 2005)
Tokyo, Jaapan	Parasvööde	15.1	54	23	12	12	(Harada <i>et al.</i> , 2012)
Norra	Parasvööde/polaarvööde	6.2	15	30	30	25	(Grude <i>et al.</i> , 2007)
Bogotá, Kolumbia	Troopiline vööde	13.0	14	25	57	4	(Escobar-Paramo <i>et al.</i> , 2004b)
Barcelona, Hispaania	Vahemereline kliima	16.6	18	28	20	34	(Sabate <i>et al.</i> , 2006)
Cotonou, Benin	Troopiline vööde	26.3	17	0	50	33	(Escobar-Paramo <i>et al.</i> , 2004b)

Kuseteede infektsiooniga inimeste uriinist isoleeritud ESBL-i mittetootvad *E. coli* tüved kuulusid kõige sagedamini B2 fülogruppi. See tulemus on kooskõlas seniste uuringutega, kus kuseteede infektsiooni põhjustavatest *E. coli* tüvedest ligikaudu 2/3 kuuluvad fülogruppi B2. Uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse on näidatud tabelis 5.

Tabel 5. Kuseteede infektsiooniga inimeste uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. Aasta keskmised temperatuurid on pärit veebilehelt www.climateemps.com. Siniselt on märgitud riigid, milles uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetiline kuuluvus ei erinenud statistiliselt olulisel määral Eestis uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilisest kuuluvusest.

Asukoht	Kliimavööde	Aasta keskmine temperatuur (°C)	% isolaatidest				Viide
			B2	D	A	B1	
Eesti	Parasvööde	4.7	63	25	9	3	Käesolev töö
Norra	Parasvööde/polaarvööde	6.2	45	39	6	10	(Grude <i>et al.</i> , 2007)
Michigan, USA	Parasvööde	6.9	69	20	8	3	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Nimes, Prantsusmaa	Parasvööde	14.0	51	33	9	8	(Lavigne <i>et al.</i> , 2011)
Barcelona, Hispaania	Vahemereline kliima	16.6	67	17	11	5	(Sabate <i>et al.</i> , 2006)
Brisbane, Austraalia	Parasvööde	20.6	73	17	6	5	(Mabbett <i>et al.</i> , 2009)
Ulyanovsk, Venemaa	Parasvööde	3.6	23	23	55	0	(Grude <i>et al.</i> , 2007)
Aichi prefektuur, Jaapan	Parasvööde	14.5	74	9	6	11	(Kawamura-Sato <i>et al.</i> , 2010)
Lucknow, India	Troopiline vööde	25.0	47	11	29	13	(Agarwal <i>et al.</i> , 2013)

Eestis uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumine langeb kokku Norras, Michiganis (USA), Nimes'is (Prantsusmaa), Barcelonas (Hispaania) ja Brisbane'is (Austraalia) uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilise kuuluvusega. Vastavad populatsioonid asuvad erinevates kliimavöötmes (parasvööde, vahemereline kliima, polaarvööde) ja on väga erinevate aasta keskmiste temperatuuridega. Teatud faktorid võivad vastavate populatsioonide vahel olla sarnased, näiteks hügieenitase, toitumisharjumused ja antibiootikumide kasutus. Eelpool toodud tegureid peetakse kirjanduses olulisteks faktoriteks, mis mõjutavad kommensaalsete tüvede fülogruppidesse jaotumist ja võivad seega mõjutada ka ekstraintestinaalsete patogeensete tüvede fülogruppidesse jaotumist (Duriez *et al.*, 2001; Escobar-Paramo *et al.*, 2004b; Grude *et al.*, 2007).

Eestis ja Venemaal uriinist isoleeritud tüvede jaotumisel fülogruppidesse B2 ja A esinesid statistiliselt olulised erinevused (vastavalt $p < 0.001$ ja $p < 0.0001$). See kinnitab kirjanduses leitud andmeid, kus Venemaal uriinist isoleeritud ekstraintestinaalselt patogeensed *E. coli*

tüved kuulusid sagedamini fülogruppi A ja harvem fülogruppidesse B2 ja D võrreldes Norras uriinist isoleeritud *E. coli* tüvedega (Grude *et al.*, 2007).

Bakterieemiaga inimeste verest isoleeritud ESBL-i mittetootvad *E. coli* tüved kuulusid samuti kõige sagedamini B2 fülogruppi. Varasemate uuringute andmetel kuuluvad bakterieemiat põhjustavad *E. coli* tüved kõige sagedamini fülogruppi B2 või D. Verest isoleeritud *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse on näidatud tabelis 6.

Tabel 6. Bakterieemiaga patsientide verest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. Aasta keskmised temperatuurid on pärit veebilehelt www.climatemps.com. Siniselt on märgitud riigid, milles verest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetiline kuuluvus ei erinenud statistiliselt olulisel määral Eestis verest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilisest kuuluvusest.

Asukoht	Kliimavööde	Aasta keskmine temperatuur (°C)	% isolaatidest				Viide
			B2	D	A	B1	
Eesti	Parasvööde	4.7	73	22	5	0	Käesolev töö
Minneapolis, USA	Parasvööde	6.5	67	19	11	3	(Sannes <i>et al.</i> , 2004)
Taani	Parasvööde	8.6	66	17	13	4	(Bukh <i>et al.</i> , 2009)
Pariis, Prantsusmaa	Parasvööde	11.6	50	23	21	6	(Jaureguy <i>et al.</i> , 2007)
Barcelona, Hispaania	Vahemereline kliima	16.6	18	52	17	12	(Martinez <i>et al.</i> , 2006)

Eestis verest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumine langeb kokku Minneapolis (USA) verest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumisega. Taanis ja Eestis verest isoleeritud *E. coli* tüvede jaotumine B2 ja D fülogruppidesse oli sarnane.

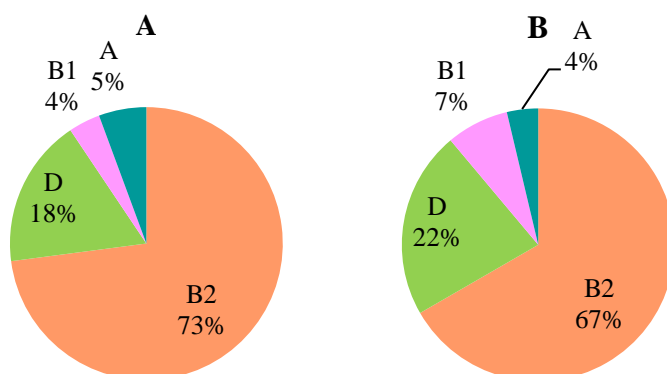
Kuigi Prantsusmaal tervete inimeste seedetraktist ja kuseteede infektsiooniga inimeste uriinist isoleeritud *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumine langes kokku Eestis vastavate inimestelt isoleeritud tüvede fülogruppidesse jaotumisega, erineb Pariisis verest isoleeritud tüvede fülogruppidesse B2, A ja B1 kuulumine Eestis isoleeritud tüvede vastavatesse fülogruppidesse kuuluvumisest (vastavalt $p < 0.0001$, $p < 0.001$ ja $p < 0.01$).

Ehkki kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvede ja kommensaalsete tüvede B2 fülogruppi kuulumine erines statistiliselt oluliselt määral, jaotusid ligi pooled antud uuringus analüüsitud kommensaalsetest *E. coli* tüvedest B2 fülogruppi. Nii ekstraintestinaalsete patogeensete kui ka kommensaalsete *E. coli* tüvede kuulumine fülogruppi B2 võib olla seotud B2 grupis esinevate fülogeneetilistest alagruppidega (I-IX) (Le Gall *et al.*, 2007). Samuti on leitud, et

B2 fülogruppi kuuluvad tüved on kohanenud seedetrakti keskkonnale, olles selles vastupidavamad. Kirjanduse andmetel kuulub lühiajaliselt soolestikus esinevatest *E. coli* tüvedest B2 fülogruppi ligi 3 korda vähem tüvesid kui pikemaajaliselt soolestikus esinevatest *E. coli* tüvedest. A ja B1 tüved on sagedasemad lühiajaliselt seedetrakti koloniseerivate *E. coli* tüvede hulgas (Nowrouzian *et al.*, 2005). A ja B1 gruppi kuuluvad *E. coli* tüved on ka madalama patogeensusega (Picard *et al.*, 1999), mille põhjuseks võib olla vähenenud võime pidada vastu inimese mikrobiotas. Antud uuringus kuulus 1/3 kommensaalsetest *E. coli* tüvedest A ja B1 fülogruppi.

2.3.2 ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse

266 uriinist isoleeritud ESBL-i tootvast *E. coli* tüvest 194 (73%), 47 (18%), 15 (6%) ja 10 (4%) tüve kuulusid vastavalt fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D, A ja B1 (joonis 8). 27 verest isoleeritud ESBL-i tootvast *E. coli* tüvest 18 (67%), 6 (22%), 1 (4%) ja 2 (7%) tüve kuulusid vastavalt fülogeneetilistesse gruppidesse B2, D, A ja B1 (joonis 8).



Joonis 8. Uriinist (A) ja verest (B) isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse.

Arvestades kõikides Läänemere piirkonna riikides isoleeritud tüvesid koos, ei erinenud uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetiline kuuluvus statistiliselt olulisel määral verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilisest kuuluvusest. Samuti ei erinenud üksikutes riikides uriinist ja verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine statistiliselt olulisel määral.

Kliinilistest materjalidest (uriin ja veri) isoleeritud ESBL-positiivsed *E. coli* tüved kuulusid enamasti fülogruppi B2 (tabel 7). Statistiliselt olulised riikidevahelised erinevused esinesid tüvede jaotumisel fülogruppidesse B2 ja D (tabel 7). Lätis esines B2 fülogrupi tüvesid

sagedamini kui Eestis, Leedus ja Peterburis (vastavalt $p < 0.05$, $p < 0.01$ ja $p < 0.0001$). Samuti esines B2 fülogruppi sagedamini Eestis kui Peterburis ($p < 0.0001$). Eestis ja Lätis esines D fülogrupi tüvesid harvemini kui Leedus (vastavalt $p < 0.05$ ja $p < 0.01$) ja Peterburis (vastavalt $p < 0.0001$ ja $p < 0.0001$).

Tabel 7. Erinevates riikides uriinist ja verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. p -väärtused ^{a,e} < 0.05 , ^{b,g} < 0.01 ja ^{c,d,f,h} < 0.0001 väljendavad statistiliselt olulisi erinevusi erinevatest kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvede fülogeneetiliste kuuluvuste vahel.

<i>E. coli</i> päritoluriik (n)	Fülogeneetiline grupp % (n)			
	B2	D	A	B1
Eesti (117)	81 ^{a,d} (95)	9 ^{e,f} (10)	8 (9)	3 (3)
Läti (60)	93 ^{a,b,c} (56)	2 ^{g,h} (1)	2 (1)	3 (2)
Leedu (26)	65 ^b (17)	23 ^{e,g} (6)	8 (2)	4 (1)
Peterburi (90)	49 ^{c,d} (44)	40 ^{f,h} (36)	4 (4)	7 (6)

2.3.2.1 Uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse

Eestis, Lätis, Leedus ja Peterburis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumine on näidatud tabelis 8.

Tabel 8. Erinevates riikides uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. p -väärtused ^{a,f} < 0.05 , ^b < 0.01 ja ^{c,d,e,g} < 0.0001 väljendavad statistiliselt olulisi erinevusi uriinist isoleeritud tüvede fülogeneetiliste kuuluvuste vahel.

<i>E. coli</i> päritoluriik (n)	Fülogeneetiline grupp % (n)			
	B2	D	A	B1
Eesti (110)	82 ^{a,d} (90)	8 ^e (9)	7 (8)	3 (3)
Läti (52)	94 ^{a,b,c} (49)	2 ^{f,g} (1)	2 (1)	2 (1)
Leedu (19)	68 ^b (13)	21 ^f (4)	11 (2)	0 (0)
Peterburi (85)	49 ^{c,d} (42)	39 ^{e,g} (33)	5 (4)	7 (6)

Erinevates riikides uriinist isoleeritud ESBL-positiivsed *E. coli* tüved kuulusid enamasti fülogruppi B2, kusjuures Lätis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsed tüved kuulusid statistiliselt olulisel määral sagedamini B2 gruppi kui Eestis, Leedus ja Peterburiis isoleeritud tüved (vastavalt $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$) (tabel 8). Samuti oli Eestis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede hulgas enam B2 fülogeneetilist gruppi kui Peterburis isoleeritud

tüvede hulgas ($p < 0.0001$) (tabel 8). Need andmed langevad kokku riikidevaheliste erinevustega, kui arvestati uriinist ja verest eraldatud tüvesid koos.

Peterburis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsed tüved kuulusid statistiliselt olulisel määral sagedamini D gruppi kui Eestis ($p < 0.0001$) ja Lätis ($p < 0.0001$) isoleeritud tüved (tabel 8). Lisaks kuulusid Leedus uriinist isoleeritud tüved statistiliselt olulisel määral sagedamini D gruppi kui Lätis uriinist isoleeritud tüved ($p < 0.05$) (tabel 8). Need andmed langevad osaliselt kokku riikidevaheliste erinevustega, kui arvestati uriinist ja verest eraldatud tüvesid koos. Kui uriinist ja verest eraldatud tüvesid koos arvestati, kuulusid Leedus isoleeritud tüved sagedamini D fülogruppi kui Eestis isoleeritud tüved. Arvestades ainult uriinist isoleeritud tüvesid, ei erinenud Eestis ja Leedus isoleeritud tüvede D fülogruppi jaotumine statistiliselt olulisel määral.

Uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede jaotumisel fülogruppidesse A ja B1 ei esinenud riikidevahelisi erinevusi. See langeb kokku riikidevaheliste erinevustega, kui arvestati uriinist ja verest eraldatud tüvesid koos.

2.3.2.2 Verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse

Eestis, Lätis, Leedus ja Peterburis verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumine on näidatud tabelis 9.

Tabel 9. Erinevates riikides verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumine. p -väärtus ^a < 0.05 väljendab statistiliselt olulist erinevust verest isoleeritud tüvede fülogeneetiliste kuuluvuste vahel.

<i>E. coli</i> päritoluriik (n)	Fülogeneetiline grupp % (n)			
	B2	D	A	B1
Eesti (7)	71 (5)	14 (1)	14 (1)	0 (0)
Läti (8)	88 (7)	0 ^a (0)	0 (0)	13 (1)
Leedu (7)	57 (4)	29 (2)	0 (0)	14 (1)
Peterburi (5)	40 (2)	60 ^a (3)	0 (0)	0 (0)

Eestis, Lätis ja Leedus verest isoleeritud ESBL-positiivsed *E. coli* tüved kuulusid enamasti fülogruppi B2 (tabel 9). Peterburis verest isoleeritud *E. coli* tüved kuulusid enamasti fülogruppi D (tabel 9). Tüvede B2 fülogruppi jaotumisel puudusid statistiliselt olulised riikidevahelised erinevused. Peterburis verest isoleeritud ESBL-positiivsed tüved kuulusid

sagedamini D fülogruppi kui Lätis isoleeritud tüved ($p < 0.05$) (tabel 9). Verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumisel fülogruppidesse A ja B1 ei esinenud riikidevahelisi erinevusi.

Eestis, Lätis ja Leedus uriinist ja verest ning Peterburis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede kuulumine suuremalt jaolt fülogruppi B2 langeb kokku seniste andmetega, kus on leitud positiivne korrelatsioon B2 fülogrupi ja ESBL-ide tootmise vahel (Nazir *et al.*, 2011). See võib viidata teatud B2 fülogrupi omadustele, mis soodustavad ESBL-ide tootmist põhjustavate determinantide omastamist mutatsioonide või horisontaalse geeniülekanne kaudu (Nazir *et al.*, 2011).

Erinevaid ESBL-ide alatüüpe tootvad tüved kuuluvad erinevatesse fülogruppidesse- ESBL_{SHV}- ja ESBL_{TEM}-positiivsed tüved kuuluvad enamasti B2 fülogruppi ning ESBL_{CTX-M}-positiivsed tüved kuuluvad enamasti D fülogruppi (Branger *et al.*, 2005). Samas on leitud fülogruppidesse jaotumisel erinevusi ka erinevates ESBL_{CTX-M} alagruppides: ESBL_{CTX-M-1} kuuluvad enamasti B2 fülogruppi ja ESBL_{CTX-M-9} kuuluvad D fülogruppi (Lee *et al.*, 2010). Erinevate ESBL-ide alamtüüpide osakaalu riikidevahelised erinevused võivad olla leitud riikidevaheliste erinevuste põhjuseks.

2.3.3 ESBL-negatiivsete ja ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede võrdlus

Eestis uriinist ja verest isoleeritud ESBL-negatiivsete ja -positiivsete *E. coli* tüvede fülogruppidesse jaotumise võrdlus on näidatud tabelis 10.

Eestis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsed *E. coli* tüved kuulusid sagedamini B2 fülogruppi ($p < 0.01$) ja harvemini D fülogruppi ($p < 0.01$) kui uriinist isoleeritud ESBL-negatiivsed *E. coli* tüved (tabel 10). Uriinist isoleeritud ESBL-negatiivsete ja -positiivsete tüvede jaotumisel fülogruppidesse A ja B1 ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi. Eestis verest isoleeritud ESBL-positiivsete ja -negatiivsete tüvede jaotumisel fülogruppidesse B2, D, A ja B1 ei esinenud statistiliselt olulisi erinevusi (tabel 10).

Tabel 10. Eestis uriinist ja verest isoleeritud ESBL-negatiivsete ja -positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumise võrdlus. p-väärtused ^{a,b} <0.01 väljendavad statistiliselt olulisi erinevusi uriinist isoleeritud ESBL-negatiivsete ja -positiivsete tüvede fülogeneetiliste kuuluvuste vahel.

Tüve päritolu	ESBL-positiivne/negatiivne (n)	Fülogeneetiline grupp % (n)			
		B2	D	A	B1
Uriinist isoleeritud	ESBL-positiivsed tüved (110)	82 ^a (90)	8 ^b (9)	7 (8)	3 (3)
	ESBL-negatiivsed tüved (96)	63 ^a (60)	25 ^b (24)	9 (9)	3 (3)
Verest isoleeritud	ESBL-positiivsed tüved (7)	71 (5)	14 (1)	14 (1)	0 (0)
	ESBL-negatiivsed tüved (112)	73 (82)	22 (25)	5 (5)	0 (0)

B2 fülogeneetilise grupi suur osakaal uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede hulgas kinnitab korrelatsiooni B2 fülogrupi ja ESBL-ide tootmise vahel (Nazir *et al.*, 2011). B2 fülogruppi kuuluvate tüvede suurem hulk ESBL-positiivsete tüvede hulgas ja D fülogruppi kuuluvate tüvede harvem esinemine uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede hulgas võib olla seotud teatud tüüpi ESBL-ide esinemisega, mis on seotud pigem B2 fülogrupiga (ESBL_{SHV} ja ESBL_{TEM}) kui D fülogrupiga (ESBL_{CTX-M}) (Branger *et al.*, 2005).

Põhjuseks, miks verest isoleeritud ESBL-negatiivsete ja -positiivsete tüvede fülogruppidesse jaotumise vahel ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi, võib olla verest isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede väike hulk, mis ei pruugi anda tegelikust olukorrast ülevaadet.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda kommensaalsete ja ekstraintestinaalseid infektsioone põhjustanud ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilist kuuluvust; võrrelda erinevates Läänemere piirkonna riikides (Eesti, Läti, Leedu, Venemaa (Peterburi)) uriinist ja verest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetilist kuuluvust; võrrelda uriinist ja verest isoleeritud ESBL-positiivsete ja -negatiivsete *E. coli* fülogeneetilist kuuluvust.

E. coli tüved isoleeriti Eestis tervete inimeste roojast; Eestis, Lätis, Leedus ja Peterburis elavate kuseteede infektsiooniga inimeste uriinist ja baktereemiaga inimeste verest. Roojast, uriinist ja verest isoleeritud *E. coli* tüvedest eraldati bakteriaalne DNA ning *triplex-PCR*-i ja geelelektroforeesi abil tehti kindaks *chuA*, *yjaA* ja TSPE4.C2 olemasolu või puudumine. Selle alusel määrati tüvede fülogeneetiline kuuluvus fülogruppi B2, D, A või B1 (Clermont *et al.*, 2000).

Tulemused:

- 1) Eesti kommensaalsete ja kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-negatiivsete *E. coli* tüvede fülogeneetiline jaotumus:
 - Eestis uriinist ja verest isoleeritud ESBL-negatiivsed *E. coli* tüved kuulusid sagedamini B2 fülogeneetilisse gruppi kui kommensaalsed tüved. See kinnitab varasemate uuringute andmeid, kus on leitud, et enamus ekstraintestinaalselt patogeenseid *E. coli* tüvesid kuuluvad fülogruppi B2 ja enamus kommensaalsetest tüvedest B1 ja A fülogruppidesse.
 - Kuigi kliinilistest materjalidest isoleeritud tüvede ja kommensaalsete tüvede B2 fülogruppi kuulumine erines statistiliselt oluliselt määral, jaotusid ligi pooled antud uuringus analüüsitud kommensaalsetest *E. coli* tüvedest B2 fülogruppi. Kommensaalsete *E. coli* tüvede jaotumine Eestis oli sarnane teistes parasvöötme riikides tehtud uuringutega. See kinnitab Prantsusmaal vaadeldud tendentsi, kus 20 aasta jooksul suurenes B2 grupi tüvede osakaal, mis võib olla seotud toitumisharjumuste ja hügieenitaseme muutumisega.
- 2) Läänemere piirkonna riikide kliinilistest materjalidest isoleeritud ESBL-positiivsete *E. coli* tüvede jaotumus:
 - Uriinist ja verest isoleeritud ESBL-positiivsed tüved kuulusid enamasti B2 fülogruppi (Lätis 93%; Eestis 81%, Leedus 65%, Peterburis 49%)
 - Eestis, Lätis ja Leedus uriinist ja verest ning Peterburis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsete tüvede kuulumine suuremalt jaolt fülogruppi B2 langeb

kokku seniste andmetega, kus on leitud positiivne korrelatsioon B2 fülogrupi ja ESBL-ide tootmise vahel (Nazir *et al.*, 2011). Riikidevaheliste fülogeneetilise jaotumise erinevuste põhjuseks võib olla erinevate ESBL-ide alamtüüpide osakaalu erinevused riikide vahel (Branger *et al.*, 2005).

3) Kliinilisest materjalist isoleeritud ESBL-positiivsete ja -negatiivsete *E. coli* tüvede võrdlus:

- Eestis uriinist isoleeritud ESBL-positiivsed *E. coli* tüved kuulusid sagedamini B2 fülogruppi ja harvemini D fülogruppi kui uriinist isoleeritud ESBL-negatiivsed *E. coli* tüved. See võib olla seotud teatud tüüpi ESBL-ide esinemisega, mis on seotud pigem B2 fülogrupiga (ESBL_{SHV} ja ESBL_{TEM}) kui D fülogrupiga (ESBL_{CTX-M}) (Branger *et al.*, 2005).

Antud töö tulemusena leiti, et ESBL-positiivsed tüved kuuluvad enamasti B2 fülogeneetilisse gruppi ning et *E. coli* tüvede fülogeneetilistesse gruppidesse jaotumisel esinevad riikidevahelised erinevused. Töö tulemused kinnitasid varasemate uuringute leide. Töös võrreldi esmakordselt Balti regiooni riikide kliinilistest materjalidest isoleeritud *E. coli* tüvede fülogeneetilist jaotumist. Edaspidised uuringud peaksid keskenduma leitud erinevuste põhjuste (viruletsusgeenide olemasolu, toitumusharjumuste erinevus, peremehe tervislik seisund jne) uurimisele.

Summary

Phylogenetic distribution of *E. coli* strains isolated from clinical samples and human normal microbiota

Kristel Parv

Escherichia coli is a Gram-negative motile rod and the most abundant facultative anaerobe in the feces of humans (Schaechter, 2009). *E. coli* strains can be commensal and/or cause various infections (intestinal and extraintestinal infections) (Picard *et al.*, 1999). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains cause 90% of urinary tract infections and 18–37% of bacteremia cases (Russo ja Johnson, 2003; Madigan *et al.*, 2011). The most common antibiotics used for *E. coli* infection treatment are β -lactam antibiotics (Mims *et al.*, 2004) and due to frequent use of these antibiotics, bacteria have developed resistance against them (Meier *et al.*, 2011). In Gram-negative pathogens, β -lactamase production remains the most important contributing factor to β -lactam resistance and organisms that produce Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) remain an important reason for therapy failure (Pitout ja Laupland, 2008).

Although virulence determinants are considered to be mobile, *E. coli* strains phylogenetic classification (B2, D, A or B1) has been shown to be linked to its virulence and production of ESBLs. Most of ExPEC and ESBL-positive *E. coli* strains have been shown to belong to groups B2 and D. Commensal strains mainly belong to groups A and B1 (Picard *et al.*, 1999; Branger *et al.*, 2005; Nazir *et al.*, 2011).

The aim of this study was to compare the phylogenetic classification of ESBL-negative commensal *E. coli* and ExPEC strains; to compare the phylogenetic classification of ESBL-positive *E. coli* strains isolated from blood and urine of people from different countries in the Baltic region (Estonia, Latvia, Lithuania, Russia (St. Petersburg)); and to compare the phylogenetic classification of ESBL-positive and ESBL-negative ExPEC strains isolated from blood and urine.

E. coli strains were isolated from the fecal samples of healthy people in Estonia (130 ESBL-negative strains); from the urine of patients with urinary tract infection in Estonia (96 ESBL-negative and 110 ESBL-positive strains), Latvia (52 ESBL-positive strains), Lithuania (19 ESBL-positive strains), and St. Petersburg (85 ESBL-positive strains); and from the blood of bacteremic patients in Estonia (112 ESBL-negative and 7 ESBL-positive strains), Latvia (8 ESBL-positive strains), Lithuania (7 ESBL-positive strains), and St. Petersburg (5 ESBL-

positive strains). Isolated *E. coli* strains' antibiotic susceptibility was determined, DNA was extracted and the presence or absence of genes *chuA* and *yjaA* and DNA fragment TSPE4.C2 was determined using triplex-PCR and gel electrophoresis in order to determine the strains phylogenetic group (Clermont *et al.*, 2000).

Results:

- The phylogenetic classification of ESBL-negative commensal *E. coli* and ExPEC strains (isolated in Estonia):
 - ESBL-negative strains isolated from urine and blood belonged to phylogroup B2 (63% and 73%, respectively) more frequently than commensal strains (45%). This consents with previous studies, where ExPEC strains have mainly been found to belong to phylogroup B2, and commensal strains to phylogroups B1 and A.
 - Although ExPEC strains isolated from urine and blood belonged to group B2 more frequently ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) than commensal strains, 45% of commensal strains belonged to phylogroup B2, whereas this data coincides with data from other temperate climate zone countries. This confirms the tendency noted in France over a 20-year period, where an increase in B2 group commensal strains was observed. These changes may be a result of social evolution involving changes in dietary habits and level of hygiene (Escobar-Paramo *et al.*, 2004b).
- ESBL-positive *E. coli* strains isolated from urine and blood in Baltic region countries:
 - Strains isolated from urine and blood mainly belonged to phylogroup B2 (Latvia 93%; Estonia 81%; Lithuania 65%; St. Petersburg 49%).
 - ESBL-positive *E. coli* strains mainly belonging to phylogroup B2 confirms previously found positive correlation between ESBL-production and phylogroup B2 (Nazir *et al.*, 2011). Inter-country phylogenetic classification differences found in this study may be explained by the varying prevalences of different subtypes of ESBLs in these countries (Branger *et al.*, 2005).
- Comparison of ESBL-negative and -positive *E. coli* strains isolated from urine and blood:
 - ESBL-positive strains isolated from urine belonged to group B2 more frequently and to group D less frequently than ESBL-negative strains isolated from urine. These results may show the abundance of certain subtypes of

ESBLs which are linked with group B2 (ESBL_{SHV} and ESBL_{TEM}) rather than group D (ESBL_{CTX-M}) (Branger *et al.*, 2005).

As a result of this study, it was found that there is positive correlation between ESBL-production and phylogroup B2, and also that there are inter-country differences concerning the distribution of *E. coli* strain into phylogroups. The study results confirm the findings of previous studies in the field. The phylogenetic distribution of ESBL-positive *E. coli* strains in the countries of the Baltic region was assessed for the first time in this study. Future studies concerned with the reasons behind the found differences (the occurrence of virulence genes, differences in dietary habits, the general health of the host, etc.) are suggested.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid:

- Agarwal, J., B. Mishra, S. Srivastava ja R. Srivastava (2013). Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107(3): 183-187.
- Branger, C., O. Zamfir, S. Geoffroy, G. Laurans, G. Arlet, H. V. Thien, S. Gouriou, B. Picard ja E. Denamur (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 11(1): 54-61.
- Bukh, A. S., H. C. Schonheyder, J. M. Emmersen, M. Sogaard, S. Bastholm ja P. Roslev (2009). *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Chemother* 64(1): 163-168.
- Camins, B. C., J. Marschall, S. R. DeVader, D. E. Maker, M. W. Hoffman ja V. J. Fraser (2011). The clinical impact of fluoroquinolone resistance in patients with *E coli* bacteremia. *J Hosp Med* 6(6): 344-349.
- Cherkaoui, A., J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois ja J. Schrenzel (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 48(4): 1169-1175.
- Clermont, O., S. Bonacorsi ja E. Bingen (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4555-4558.
- Croxatto, A., G. Prod'homme ja G. Greub (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 36(2): 380-407.
- Dore, J. ja G. Corthier (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroenterol Clin Biol* 34 Suppl 1: S7-15.
- Drieux, L., F. Brossier, W. Sougakoff ja V. Jarlier (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1: 90-103.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard ja E. Denamur (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147(Pt 6): 1671-1676.
- Escobar-Paramo, P., O. Clermont, A. B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguenec ja E. Denamur (2004a). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 1085-1094.
- Escobar-Paramo, P., K. Grenet, A. Le Menac'h, L. Rode, E. Salgado, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, M. C. Rahimy, A. Andremon, E. Denamur ja R. Ruimy (2004b). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* 70(9): 5698-5700.
- Escobar-Paramo, P., A. Le Menac'h, T. Le Gall, C. Amorin, S. Gouriou, B. Picard, D. Skurnik ja E. Denamur (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 8(11): 1975-1984.
- Giriyaapur, R. S., N. W. Nandihal, B. V. Krishna, A. B. Patil ja M. R. Chandrasekhar (2011). Comparison of disc diffusion methods for the detection of extended-spectrum Beta lactamase-producing *enterobacteriaceae*. *J Lab Physicians* 3(1): 33-36.
- Giske, C. G., A. S. Sundsfjord, G. Kahlmeter, N. Woodford, P. Nordmann, D. L. Paterson, R. Canton ja T. R. Walsh (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 63(1): 1-4.

- Gordon, D. M., O. Clermont, H. Tolley ja E. Denamur (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10(10): 2484-2496.
- Gordon, D. M., S. E. Stern ja P. J. Collignon (2005). Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* 151(Pt 1): 15-23.
- Grude, N., N. I. Potaturkina-Nesterova, A. Jenkins, L. Strand, F. L. Nowrouzian, J. Nyhus ja B. E. Kristiansen (2007). A comparison of phylogenetic group, virulence factors and antibiotic resistance in Russian and Norwegian isolates of *Escherichia coli* from urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect* 13(2): 208-211.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer ja H. Tschape (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23(6): 1089-1097.
- Harada, K., E. Okada, T. Shimizu, Y. Kataoka, T. Sawada ja T. Takahashi (2012). Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: a comparative analysis between dogs and their owners in Japan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35(2): 139-144.
- Hekker, T. A., A. B. Groeneveld, A. M. Simoons-Smit, P. de Man, H. Connell ja D. M. MacLaren (2000). Role of bacterial virulence factors and host factors in the outcome of *Escherichia coli* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19(4): 312-316.
- Hsieh, C. J., Y. H. Shen ja K. P. Hwang (2010). Clinical implications, risk factors and mortality following community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Immunol Infect* 43(3): 240-248.
- Huang, T. D., P. Bogaerts, C. Berhin, A. Guisset ja Y. Glupczynski (2010). Evaluation of Brilliance ESBL agar, a novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum-beta- lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 48(6): 2091-2096.
- Jauregui, F., E. Carbonnelle, S. Bonacorsi, C. Clec'h, P. Casassus, E. Bingen, B. Picard, X. Nassif ja O. Lortholary (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clin Microbiol Infect* 13(9): 854-862.
- Jauregui, F., L. Landraud, V. Passet, L. Diancourt, E. Frapy, G. Guigon, E. Carbonnelle, O. Lortholary, O. Clermont, E. Denamur, B. Picard, X. Nassif ja S. Brisse (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9: 560.
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4(1): 80-128.
- Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski ja A. L. Stell (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183(1): 78-88.
- Johnson, J. R., P. Goulet, B. Picard, S. L. Moseley, P. L. Roberts ja W. E. Stamm (1991). Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. *Infect Immun* 59(7): 2311-2315.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, A. Gajewski, S. Soto, J. P. Horcajada, M. T. Jimenez de Anta ja J. Vila (2005). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* 191(1): 46-50.
- Johnson, J. R., C. van der Schee, M. A. Kuskowski, W. Goessens ja A. van Belkum (2002). Phylogenetic background and virulence profiles of fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from the Netherlands. *J Infect Dis* 186(12): 1852-1856.

- Kawamura-Sato, K., R. Yoshida, K. Shibayama ja M. Ohta (2010). Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *Jpn J Infect Dis* 63(2): 113-115.
- Lavigne, J. P., A. Boutet-Dubois, D. Laouini, C. Combescure, N. Bouziges, P. Mares ja A. Sotto (2011). Virulence potential of *Escherichia coli* strains causing asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Clin Microbiol* 49(11): 3950-3953.
- Le Gall, T., O. Clermont, S. Gouriou, B. Picard, X. Nassif, E. Denamur ja O. Tenaillon (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* 24(11): 2373-2384.
- Lee, D. S., C. B. Lee ja S. J. Lee (2010). Prevalence and risk factors for extended spectrum Beta-lactamase-producing uropathogens in patients with urinary tract infection. *Korean J Urol* 51(7): 492-497.
- Lee, S., J. K. Yu, K. Park, E. J. Oh, S. Y. Kim ja Y. J. Park (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Ann Clin Lab Sci* 40(4): 361-367.
- Livermore, D. M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, G. Arlet, J. Ayala, T. M. Coque, I. Kern-Zdanowicz, F. Luzzaro, L. Poirel ja N. Woodford (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59(2): 165-174.
- Lorian, V. (2005). Antibiotics in Laboratory medicine, Lippincott Williams & Wilkins.
- Mabbett, A. N., G. C. Ulett, R. E. Watts, J. J. Tree, M. Totsika, C. L. Ong, J. M. Wood, W. Monaghan, D. F. Looke, G. R. Nimmo, C. Svanborg ja M. A. Schembri (2009). Virulence properties of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 299(1): 53-63.
- Macheboeuf, P., D. S. Fischer, T. Brown, Jr., A. Zervosen, A. Luxen, B. Joris, A. Dessen ja C. J. Schofield (2007). Structural and mechanistic basis of penicillin-binding protein inhibition by lactvicins. *Nat Chem Biol* 3(9): 565-569.
- Marchesi, J. ja F. Shanahan (2007). The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis* 20(5): 508-513.
- Marrs, C. F., L. Zhang ja B. Foxman (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* 252(2): 183-190.
- Martinez, J. A., S. Soto, A. Fabrega, M. Almela, J. Mensa, A. Soriano, F. Marco, M. T. Jimenez de Anta ja J. Vila (2006). Relationship of phylogenetic background, biofilm production, and time to detection of growth in blood culture vials with clinical variables and prognosis associated with *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol* 44(4): 1468-1474.
- Meier, S., R. Weber, R. Zbinden, C. Ruef ja B. Hasse (2011). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection* 39(4): 333-340.
- Melzer, M. ja I. Petersen (2007). Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect* 55(3): 254-259.
- Nazir, H., S. Cao, F. Hasan ja D. Hughes (2011). Can phylogenetic type predict resistance development? *J Antimicrob Chemother* 66(4): 778-787.
- Nowrouzian, F. L., A. E. Wold ja I. Adlerberth (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis* 191(7): 1078-1083.
- Perez, F., A. Endimiani, K. M. Hujer ja R. A. Bonomo (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7(5): 459-469.

- Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion ja E. Denamur (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67(2): 546-553.
- Pitout, J. D. ja K. B. Laupland (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8(3): 159-166.
- Platteel, T. N., J. W. Stuart, G. M. Voets, J. Scharringa, N. van de Sande, A. C. Fluit ja M. A. Leverstein-Van Hall (2011). Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates from the routine clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 17(9): 1435-1438.
- Rawat, D. ja D. Nair (2010). Extended-spectrum beta-lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis* 2(3): 263-274.
- Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, M. de Cueto, M. J. Rios, J. R. Hernandez ja A. Pascual (2006). Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 43(11): 1407-1414.
- Russo, T. A. ja J. R. Johnson (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5(5): 449-456.
- Sabate, M., E. Moreno, T. Perez, A. Andreu ja G. Prats (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 12(9): 880-886.
- Sannes, M. R., M. A. Kuskowski, K. Owens, A. Gajewski ja J. R. Johnson (2004). Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* 190(12): 2121-2128.
- Schwaber, M. J., S. Navon-Venezia, K. S. Kaye, R. Ben-Ami, D. Schwartz ja Y. Carmeli (2006). Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4): 1257-1262.
- Siegel, J. D., E. Rhinehart, M. Jackson ja L. Chiarello (2007). Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *Am J Infect Control* 35(10 Suppl 2): S165-193.
- Skjot-Rasmussen, L., K. Ejrnaes, B. Lundgren, A. M. Hammerum ja N. Frimodt-Moller (2012). Virulence factors and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from patients with bacteraemia of urinary tract origin relate to sex and hospital- vs. community-acquired origin. *Int J Med Microbiol* 302(3): 129-134.
- Song, S., E. Y. Lee, E. M. Koh, H. S. Ha, H. J. Jeong, I. K. Bae ja S. H. Jeong (2009). Antibiotic resistance mechanisms of *Escherichia coli* Isolates from urinary specimens. *Korean J Lab Med* 29(1): 17-24.
- Sparbier, K., S. Schubert, U. Weller, C. Boogen ja M. Kostrzewa (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 50(3): 927-937.
- Zhang, L., B. Foxman ja C. Marrs (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology* 40(11): 3951-3955.
- Vaidya, V. K. (2011). Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance by Extended-Spectrum beta Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *J Lab Physicians* 3(1): 37-42.
- Velasco, M., J. P. Horcajada, J. Mensa, A. Moreno-Martinez, J. Vila, J. A. Martinez, J. Ruiz, M. Barranco, G. Roig ja E. Soriano (2001). Decreased invasive capacity of quinolone-

- resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 33(10): 1682-1686.
- Vila, J., K. Simon, J. Ruiz, J. P. Horcajada, M. Velasco, M. Barranco, A. Moreno ja J. Mensa (2002). Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* 186(7): 1039-1042.
- Wintermans, B. B., E. A. Reuland, R. G. Wintermans, A. M. Bergmans ja J. A. Kluytmans (2012). The cost-effectiveness of ESBL detection: towards molecular detection methods? *Clin Microbiol Infect*.

Raamatud:

- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). Colonization and Infection, p 829–830. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). Emerging and Reemerging Infectious Diseases, p 959–964. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). Isolation of Pathogens from Clinical Specimens, p 907–912. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). Microbial Evolutionary Analysis: Theoretical Aspects, p 483–485. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). The Human Microbiome, p 766–769. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, D. Clark (2011). Enteric Bacteria, p 522–524. *In* M. Madigan, J. Martinko, D. Stahl, D. Clark, *Biology of Microorganisms*, 13th ed., Pearson.
- Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman (2004). Inhibitors of Cell Wall Synthesis, p 478–485. *In* C. Mims, H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman, *Medical Microbiology*, 3rd ed., Elsevier Mosby.
- Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman (2004). Urinary Tract Infections, p 241–249. *In* C. Mims, H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman, *Medical Microbiology*, 3rd ed., Elsevier Mosby.
- Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman (2004). Pathogen Parade, p 598. *In* C. Mims, H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman, *Medical Microbiology*, 3rd ed., Elsevier Mosby.
- Schaechter, M (2009). *Escherichia Coli*, p 125–132. *In* M. Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed., vol. 2. Elsevier Academic Press.
- Scheutz, F., N. A Strockbine (2005). Genus I *Escherichia*. *In* D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2B.

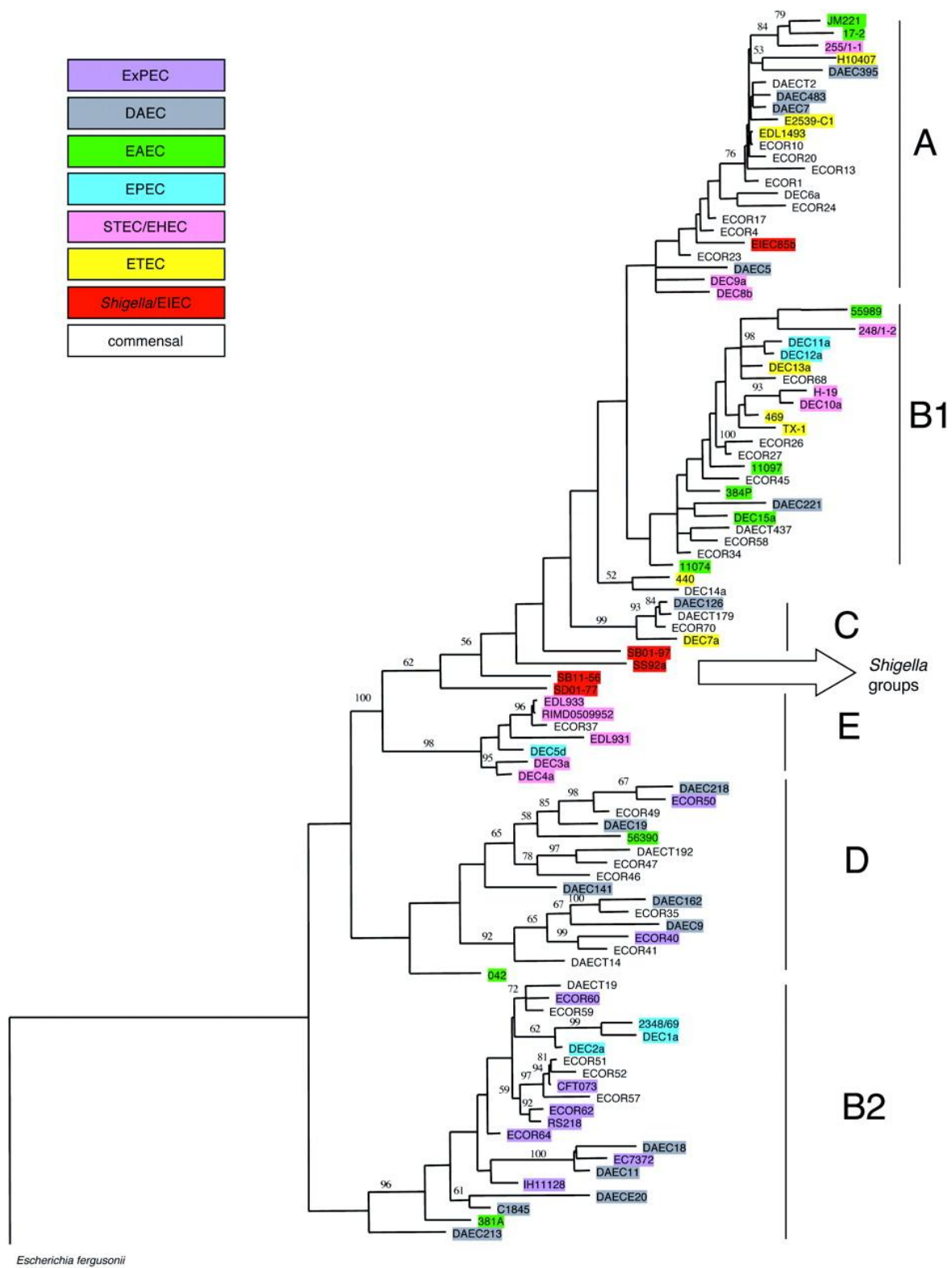
KASUTATUD VEEBIAADRESSID

www.climatemps.com

www.lucidchart.com

www.vassarstats.net/tab2x2.html

LISA 1



Parsimoonluse meetodiga saadud puu, mis põhineb 98 *E. coli*/*Shigella* tüve kuue kromosomaalse geeni (*trpA*, *trpB*, *pabB*, *putP*, *icd*, *polb*) analüüsil. Juuritud *E. fergusonii* juures (*E. coli* 'le lähim liik) (Escobar-Paramo *et al.*, 2004a).

LISA 2

E. coli identifitseerimiseks kasutatud söötme *Brilliance UTI Agar* (Oxoid) koostis:

- peptoon 15.0 g/l
- kromogeenne segu 26.3 g/l
- agar 15.0 g/l

Kõik komponendid lahustati 1 l destilleeritud vees ja autoklaaviti 121°C juures 15 min.

Lõplik pH 6.8±0.2 (25°C).

LISA 3

Tabel 11. EUCAST 2.0 kriteeriumid *E. coli* tüvede esmaseks identifitseerimiseks ESBL-positiivsena.

Antibiootikum	Diski sisu	Tulemuse lugemine positiivseks
EUCAST (2.0)		
<i>Ceftazidime</i>	10 µg	< 22 mm
<i>Cefotaxime</i>	5 µg	< 20 mm
<i>Ceftriaxone</i>	30 µg	< 23 mm
<i>Ertapenem</i>	10 µg	< 25 mm
<i>Meropenem</i>	10 µg	< 22 mm
<i>Imipenem</i>	10 µg	< 22 mm
MIK		
<i>Ceftazidime</i>		> 1 mg/L
<i>Cefotaxime</i>		> 1 mg/L
<i>Ceftriaxone</i>		> 1 mg/L
<i>Cefpodoxime</i>		> 4 mg/L
<i>Ertapenem</i>		> 0.25 mg/L
<i>Meropenem</i>		> 1 mg/L
<i>Imipenem</i>		> 1 mg/L

Tabelis 11 on EUCAST 2.0 kriteeriumid *E. coli* tüvede esmaseks identifitseerimiseks ESBL-positiivsena. Seejärel viidi läbi kinnitavad testid ROSCO diskidega (ESBL + AmpC Confirm kit):

- Võrreldi inhibitsioonitsooni suurust 30 µg *cefotaxime/ceftazidime* (CTX30/CAZ30), 30µg *cefotaxime/ceftazidime*+klavulaanhapet (CTX+C/CAZ+C) ja 30 µg *cefotaxime/ceftazidime*+cloxacillin (CTXCX/CAZCX) sisaldavate diskide ümber:
 - kui CTX30 ja CAZ30 tsoonid ei erinenud vastavalt CTXCX/CTX+C ja CAZCX/CAZ+C inhibitsioonitsoonidest rohkem kui 3 mm võrra, võis isolaadi lugeda ESBL- ja AmpC-negatiivseks.
 - Isolaat loeti ESBL-positiivseks (ESBL_A), kui CTX+C – CTX ≥ 5mm ja/või CAZ+C – CAZ ≥ 5mm.

- Isolaat loeti AmpC-positiivseks (ESBL_M), kui CTXCX-CTX \geq 5mm ja/või CAZCX-CAZ \geq 5mm. Viidi läbi PCR, eristamaks omandatud (plasmiid-vahendatud) ja kromosomaalset AmpC-d.

Lihtlitsents

Mina, Kristel Parv

(sünnikuupäev: 19.07.1991)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Inimese kliinilistest materjalidest ja seedetrakti mikrobiootast isoleeritud *Escherichia coli* tüvede jaotumine fülogeneetilistesse gruppidesse,

mille juhendaja on Epp Sepp,

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.5.2013